

# **PAPEL DEL COMPLEJO GPIb-IX EN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA DEPENDIENTE DE TROMBINA Y EN LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.**



**UAM**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Tesis doctoral**  
**Dina Pabón Realpe**  
**Mayo 2008**





FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



PAPEL DEL COMPLEJO GPIb-IX EN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA  
DEPENDIENTE DE TROMBINA Y EN LA DIFERENCIACIÓN  
MEGACARIOCÍTICA.

TESIS DOCTORAL

DINA PABÓN REALPE.



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOPATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Madrid, 2008.





FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**PAPEL DEL COMPLEJO GPIb-IX EN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA DEPENDIENTE  
DE TROMBINA Y EN LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.**

Memoria presentada por: **Dina Pabón Realpe.**  
Para optar al grado de doctor en biología molecular.

Dirigida por la Dra. **Consuelo González Manchón.**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOPATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**Madrid, 2008.**



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Consuelo González Manchón, con la financiación de una Beca Predoctoral asociada al proyecto (BMC2003 -01409) del Ministerio de Educación y Ciencia y de una beca con cargo al proyecto de referencia 2004 2 OE 263.

## ABREVIATURAS.

<b>FvW.</b>	Factor von Willebrand.	<b>PI3k.</b>	Fosfatidil inositol 3 quinasa
<b>Col.</b>	Colágeno.	<b>PKC.</b>	Proteína quinasa C.
<b>PAR.</b>	Receptores Activados por Proteínas.	<b>PVDF.</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>ADP.</b>	Adenosin difosfato.	<b>RE.</b>	Retículo endoplasmático
<b>TxA<sub>2</sub>.</b>	Tromboxano.	<b>SDS.</b>	Dodecil sulfato sódico.
<b>Fg.</b>	Fibrinógeno.	<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis geles de poliacrilamida
<b>Fn.</b>	Fibronectina.	<b>Ab.</b>	Anticuerpo.
<b>Lan.</b>	Laminina.	<b>EDTA.</b>	Ácido etilendiaminico tetraacético
<b>Vn.</b>	Vitronectina.	<b>ERK.</b>	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
<b>Trb.</b>	Trombospondina.	<b>PBS.</b>	Tapón fosfato salino.
<b>MK.</b>	Megacariocitos.	<b>WB.</b>	Western blot.
<b>TPO.</b>	Trombopoyetina.		
<b>HSCs.</b>	Células hematopoyéticas pluripotentes.		
<b>CMP.</b>	Progenitor mieloides temprano.		
<b>MEP.</b>	Progenitor MK-eritroide común.		
<b>PF4.</b>	Factor 4 Plaquetario.		
<b>SBS.</b>	Síndrome de Bernard Soulier.		
<b>RRL.</b>	Repeticiones ricas en leucina.		
<b>CHO.</b>	Células de ovario de Hamster Chino.		
<b>MAP.</b>	"Mitogen-activated protein"		
<b>MAPK.</b>	"Mitogen-activated protein kinase"		
<b>DMSO.</b>	Dimetilsulfóxido.		
<b>BSA:</b>	seroalbúmina bovina.		
<b>PCR.</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.		
<b>FITC.</b>	Isotiocianato de fluoresceína.		
<b>TB.</b>	Trombina		
<b>RT.</b>	Temperatura ambiente.		
<b>GPRP.</b>	Glicina-prolina-arginina-prolina.		
<b>BMP.</b>	Bimeparina.		
<b>STA.</b>	Estaurosporina.		
<b>PKC.</b>	Proteína C quinasa		
<b>PMA.</b>	Acido mirístico de forbol.		
<b>YP.</b>	Yoduro de propidio.		
<b>IP</b>	Inmuno-precipitación		
<b>SB.</b>	SB202190		



**RESUMEN.**

El complejo glicoprotéico de membrana GPIb-IX es un marcador tardío de la diferenciación megacariocítica, que desempeña un papel fundamental durante el proceso de activación plaquetaria cuando es activado por el factor de vonWillebrand (FvW). Se ha propuesto que la interacción del complejo GPIbIX con trombina daría lugar a cambios en la señalización celular que contribuirían a la activación del receptor del fibrinógeno, integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Por otro lado, la tasa de expresión superficial de dicho complejo condiciona la maduración y liberación de plaquetas de megacariocitos maduros y su déficit, cuantitativo o cualitativo, da lugar a fenotipos macrotrombocitopénicos. Sobre lo expuesto, en el presente trabajo hemos propuesto 2 objetivos: 1) estudiar la interacción GPIbIX-trombina y sus consecuencias sobre la activación del receptor del fibrinógeno (integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) y 2) estudiar las vías de señalización y las consecuencias funcionales de la expresión del complejo GPIb-IX en la diferenciación megacariocítica. Para analizar las consecuencias de la interacción trombina-GPIb-IX hemos generado células de ovario de hamster chino (CHO) con sobreexpresión estable de los complejos  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIb-IX humanos. Hemos podido determinar que, en presencia de fibrinógeno, la trombina induce la agregación de estas células, de forma dosis-dependiente, debido a la fijación de fibrina polimerizante. Esta respuesta no se observó en células que expresan sólo uno de los dos receptores y fue bloqueada por anticuerpos contra cada uno de estos complejos. Nuestros datos indican que esta reacción no se debe al atrapamiento de las células por la red de fibrina. Por tanto, el complejo GPIb-IX induce una conformación activa de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (distinta de la que permite fijación de fibrinógeno con alta afinidad) que le permite la fijación de fibrina polimerizante. Para el estudio del segundo objetivo hemos utilizado dos líneas celulares: las células Meg-01 megacarioblásticas y las células K562 mielomegacariocíticas. Estas líneas celulares fueron sometidas a diferentes estímulos en los que se ha seguido dos planteamientos: a) Diferenciación megacariocítica inducida mediante tratamiento con diferentes agentes inductores de diferenciación y b) Generación de clones que expresaran las proteínas del complejo GPIb-IX mediante transfecciones estables de cDNAs que codifican las proteínas de este complejo. El tratamiento de células K562 y Meg-01 con estaurosporina (STA), SB 202190 y PMA inducen propiedades fenotípicas megacarioblásticas distintas, siendo la expresión de la subunidad  $\beta$ 3 el único rasgo común. Este trabajo muestra, por primera vez, que la STA induce un fenotipo similar al del megacariocito maduro, que incluye la expresión del marcador de diferenciación terminal GPIb-IX, el aumento de ploidía, y la liberación de partículas pseudoplaquetarias. Hemos observado que de alguna manera la sobreexpresión del complejo GPIb-IX está asociada con el proceso de ploidía en la maduración megacariocítica terminal. Los resultados de activación/inhibición de proteína quinasas indican que la expresión de marcadores megacariocíticos es dependiente de la actividad de la ruta de señalización MAP quinasa ERK1/2, mas su activación sostenida no parece ser indispensable en la expresión de estos marcadores. Adicionalmente la fosforilación de ERK1/2 inducida por estaurosporina es en parte dependiente de la ruta PI3K que esta involucrada tanto en la expresión de marcadores diferenciales megacariocíticos y como en la diferenciación terminal mediando poliploidización.

INDICE.	Pg
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Fisiopatología de la hemostasia.....	1
1.2. Interacción de plaquetas con el endotelio vascular y otros tipos celulares.....	4
1.3. Estructura y función del receptor de fibrinógeno (integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ).....	5
1.4. Mecanismos de activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ .....	7
1.5. Estructural y función del complejo GPIb-IX-V, receptor del factor de Von-Willebrand (fvW).....	8
1.6. Estructura y función de la Trombina.....	10
1.7. Interacción de la proteína GPIb $\alpha$ con trombina.....	12
1.8. Macrotrombocitopenia asociada al déficit de GPIbIX, Síndrome de Bernard Soulier.....	13
1.9. Diferenciación megacariocítica y trombopoyesis.....	15
1.10. Modelos celulares en el estudio de la diferenciación megacariocítica.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivos.....	21
1. Interacción GPIbIX-trombina.....	21
2. GPIbIX-diferenciación celular.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Materiales.....	22
3.1.2. Líneas Celulares.....	22
• Células CHO (Chinese Hamster Ovary).....	22
• Línea celular K562.....	22
• Línea celular Meg-01.....	22
3.1.3. Reactivos.....	22
• Anticuerpos.....	22
• Inhibidores y otros reactivos.....	23
3.2. Métodos.....	25
3.2.1. Preparación de vectores de expresión.....	25
3.2.2. Purificación de Plásmidos.....	25
3.2.3. Purificación de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.....	25
3.2.4. Obtención de transfectantes estables en células CHO, Meg-01 y K562.....	26
• Transfecciones mediante precipitación con fosfato cálcico.....	26
• Transfecciones mediante liposomas (lipofectamina).....	26
• Transfecciones mediante nucleofección.....	27
3.2.5. Ensayos de citometría de flujo.....	27
3.2.6. Inmunofenotipaje.....	27
3.2.7. Marcaje celular con biotina e inmunoprecipitación.....	28
3.2.8. Marcaje de fibrinógeno con isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	28
3.2.9. Ensayos de unión de fibrina y FITC-PAC-1 a las células.....	29
3.2.10. Análisis de proteínas mediante Western blot o por tinción con amidoblack.....	29
• Formación de fibrina polimerizante.....	29
• Análisis de extractos celulares.....	29
3.2.11. Identificación de fosfoproteínas.....	30
3.2.12. Análisis del ciclo celular.....	31
• Ciclo celular mediante Yoduro de Propidio (YP).....	31
• Doble Marcaje con HOECHST y anticuerpos específicos.....	31

3.2.13.	Análisis de la proliferación y viabilidad celular.....	31
•	Proliferación celular por MTT.....	31
•	Viabilidad por el método de exclusión de Yoduro de Propidio (YP).....	32
•	Viabilidad mediante marcaje con Anexina V-FITC.....	32
3.2.14.	Microscopía de fluorescencia: confocal y epifluorescencia ccd.....	32
3.2.15.	Diferenciación megacariocítica con inductores.....	33
4.	RESULTADOS.....	35
4.1.	ANÁLISIS DE LAS CONSECUENCIAS FUNCIONALES QUE CONLLEVAN LA INTERACCIÓN DE TROMBINA CON EL COMPLEJO GPIb-IX EN UN MODELO CELULAR GENERADO EN NUESTRO LABORATORIO.....	35
4.1.1.	Establecimiento de líneas celulares CHO que expresan de forma estable los receptores plaquetarios $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIb-IX.....	35
4.1.2.	La trombina (TB) induce la fijación de fibrina polimerizante a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX.....	36
4.1.3.	Anticuerpos monoclonales anti-GPIb $\alpha$ y anti- $\beta$ 3 impiden la fijación de fibrinógeno marcado, inducida por trombina (TB) a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX.....	38
4.1.4.	Efecto de la trombina (TB) en células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX es mediado por fibrina Polimerizante y no por fibrinógeno.....	40
4.1.5.	Evaluación de fibrinógeno marcado con FITC mediante SDS-PAGE.....	41
4.1.6.	El exosito II de la trombina (TB) participa en la interacción trombina-GPIb $\alpha$ , y la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) participa en la interacción $\alpha$ IIb $\beta$ 3-fibrina.....	42
4.1.7.	Factores que pudieran intervenir en los procesos de señalización intracelular inducidos por trombina en células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 IbIX.....	44
4.1.8.	La fijación de fibrina a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Ib-IX inducida por la trombina es dependiente de calmodulina.....	44
4.1.9.	Los receptores PAR endógenos no están involucrados en la respuesta de las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX a trombina.....	47
4.2.	PAPEL DEL COMPLEJO GPIB-IX EN LA REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.....	49
1.	Diferenciación megacariocítica mediante tratamientos con inductores .....	49
1.1.	Diferenciación en células K562.....	49
1.1.1.	Expresión de marcadores de diferenciación en tratamientos con estaurosporina (STA), SB 202190 ó PMA.....	50
1.1.2.	Valoración de la tasa de proliferación, fenotipo y ciclo celular.....	52

1.1.3.	Análisis de las partículas liberadas al medio tras tratamientos con estaurosporina (STA) SB 202190 ó PMA.....	55
1.1.4.	Cinética Localización y distribución en superficie de $\alpha$ IIb $\beta$ 3 en células diferenciadas con estaurosporina.....	56
1.1.5.	Rutas de señalización implicadas en la diferenciación de las células K562.....	58
•	Ruta de MAPK .....	58
1.1.6.	La inhibición de ERK/MAP quinasas usando el inhibidor de MEK1, (PD98059) bloquea la diferenciación megacariocítica en células K562.....	60
1.1.7.	Activación sostenida de ERK y diferenciación megacariocítica.....	62
1.1.8.	Inducción de la diferenciación megacariocítica con medios de cultivo “condicionados” por tratamiento con estaurosporina (STA), SB 202190 ó PMA.....	63
1.1.9.	Efecto combinado de inhibidores de diferenciación.....	65
1.1.10.	Reversión de la diferenciación por el inhibidor de fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K) LY294002.....	65
1.2.	Diferenciación de células Meg-01.....	68
1.2.1.	Diferenciación megacariocítica en células Meg-01 mediante tratamiento con estaurosporina, SB 202190 o ésteres de forbol (PMA).....	68
2.	Maduración terminal megacariocítica mediante la generación de transfectantes estables que sobrexpresan las proteínas que conforman el complejo GPIb-IX.....	70
2.1	Generación de clones de células K562 con sobreexpresión estable del complejo GPIb-IX ...	70
2.2	Generación de transfectantes de células Meg-01 con sobreexpresión de las proteínas silvestres del complejo GPIb-IX.....	73
5.	DISCUSIÓN.....	74
5.1	Interacción del complejo GPIbIX (receptor del factor de von-Willebrand) con el receptor de fibrinógeno ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3).....	74
5.2	Papel del complejo GPIbIX en la regulación de la diferenciación megacariocítica.....	79
6.	CONCLUSIONES.....	88
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	91
8.	ANEXOS.....	108

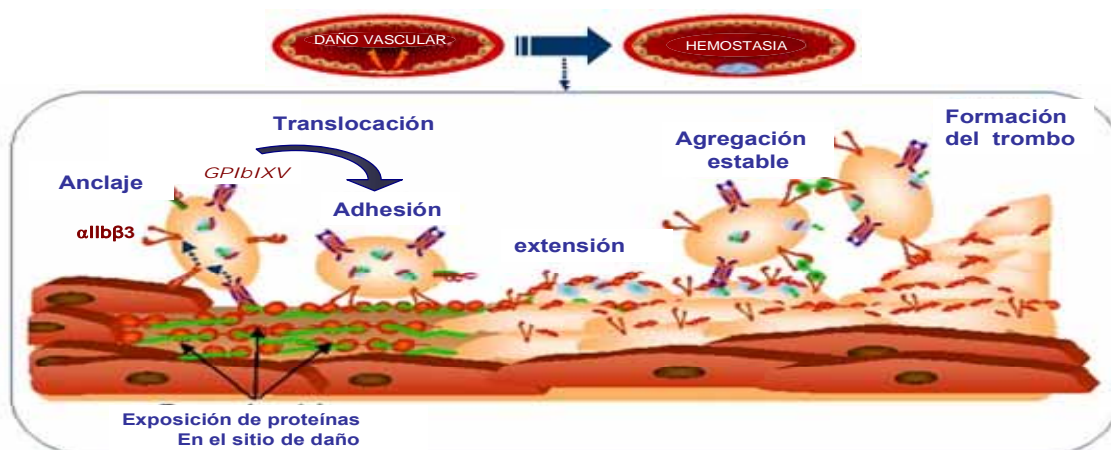
## ***INTRODUCCIÓN***

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Fisiopatología de la Hemostasia.

La hemostasia es el resultado es un delicado equilibrio que permite prevenir de forma continua la pérdida de sangre y detener la hemorragia ante un daño vascular, sin alterar la fluidez sanguínea en ausencia de dicho daño. El control de la hemostasia se produce como consecuencia de interacciones complejas entre factores derivados del endotelio vascular, de elementos formes de la sangre y de componentes del plasma. El defecto de factores procoagulantes da lugar a trastornos hemorrágicos, mientras que su exceso produce alteraciones trombóticas. En los procesos hemostáticos se diferencian aquellos efectos en los que intervienen las plaquetas, hemostasia primaria, de aquellos en los que intervienen factores de la cascada de coagulación, también englobados como hemostasia secundaria. En condiciones fisiológicas, ambos procesos tienen lugar de forma simultánea (Andrews *et al.*, 1997; Kulkarni *et al.*, 2000).

Durante la hemostasia las plaquetas siguen secuencialmente las siguientes etapas: 1) adhesión al subendotelio expuesto tras el daño vascular; 2) extensión sobre la superficie subendotelial; 3) secreción del contenido granular; 4) formación de agregados de plaquetas y 5) finalmente, como consecuencia del proceso de activación plaquetaria se acelera la actividad procoagulante de los componentes plasmáticos, lo que da como resultado la formación de una red de fibrina que refuerza el “tapón” formado por plaquetas. En una etapa posterior se producirá la retracción del coagulo (Figura. 1).

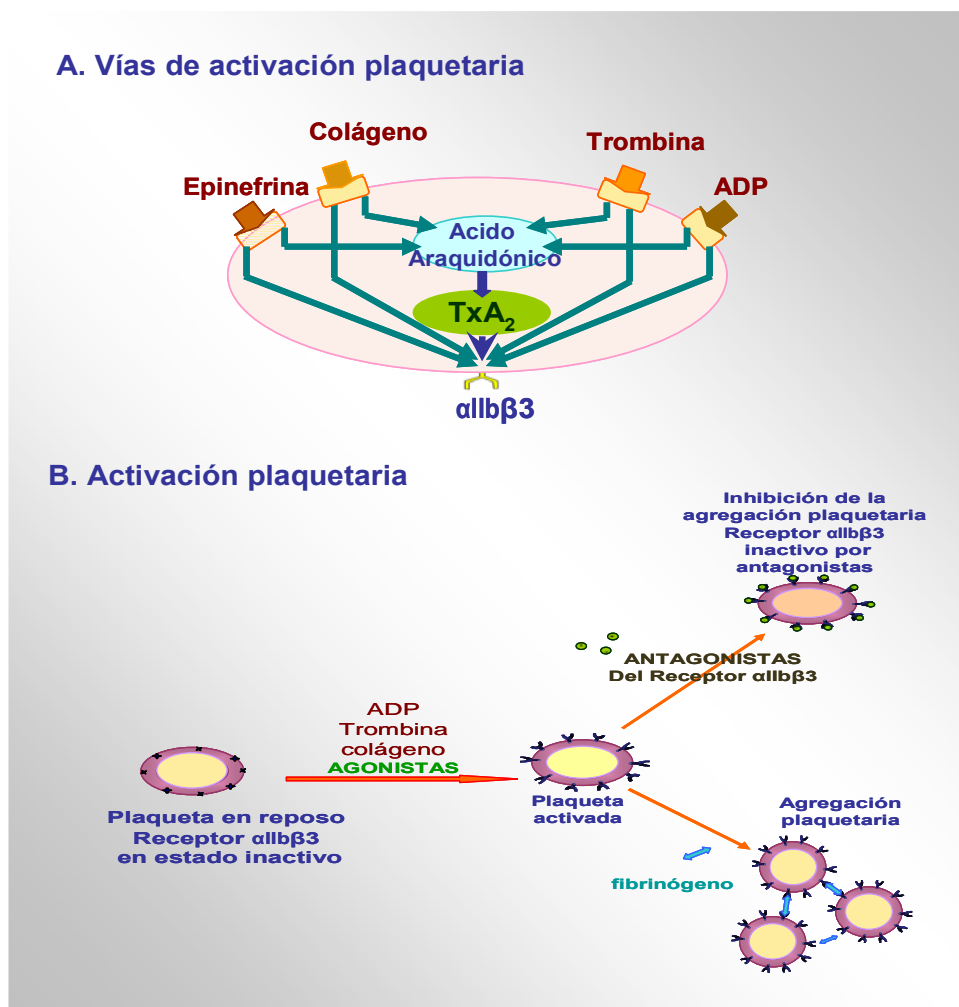


**Figura 1. Secuencia de acontecimientos en la activación plaquetaria tras una lesión vascular.** La adhesión plaquetaria a la superficie vascular lesionada es mediada por la fijación de factor von Willebrand (FvW) a su receptor de la membrana plaquetaria (GP IbIX). Las plaquetas se anclan también a la pared del vaso dañado mediante los receptores de colágeno (Col). En respuesta a estos diferentes estímulos, las plaquetas adheridas se activan y se inicia la agregación que es mediada por la fijación de fibrinógeno a sus receptores en la superficie de la plaqueta, la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , dando lugar a la formación de puentes de fibrinógeno y la formación de una “malla” de fibrina conteniendo el coagulo plaquetario.

Las plaquetas circulan en los vasos sanguíneos en forma “inactiva” lo que desde el punto de vista molecular implica una baja afinidad del receptor de fibrinógeno, la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , por su ligando por lo que la formación de agregados plaquetarios no es posible. Durante el proceso de activación plaquetaria se producen cambios celulares y moleculares que inducen la activación del receptor aumentando la afinidad por su ligando. Desde el punto de vista celular, llaman la atención el aumento de actividad metabólica y los cambios de forma y tamaño de las plaquetas. Desde el punto de vista molecular el fenómeno de mayor interés es la activación del receptor de fibrinógeno que implica un aumento de afinidad por su ligando y la consiguiente agregación plaquetaria (Shattil y Bennett, 1981). El mecanismo molecular de activación del receptor de fibrinógeno no está totalmente aclarado; en la actualidad se asume que la activación se iniciaría como consecuencia de los cambios conformacionales producidos en los dominios citosólicos del heterodímero  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , lo que podría modificar la afinidad de la región extracelular por el fibrinógeno (Bonney *et al.*, 2000). Existen evidencias experimentales que apoyan la existencia de diferentes tipos de cambios conformacionales, en respuesta a distintos estímulos, que conducirían a diferentes afinidades del receptor por su ligando (Calzada *et al.*, 2002; Bonney *et al.*, 2001; Podolnikova *et al.*, 2003).

Cuando se producen lesiones en el endotelio vascular y queda expuesta la matriz subendotelial, se produce un aumento local de ligandos que actuarán sobre la membrana plaquetaria. Existen dos tipos de ligandos: 1) agonistas de receptores acoplados a proteínas G reguladoras, y 2) proteínas extracelulares de adhesión, que actúan como ligandos de receptores específicos presentes en la membrana plaquetaria. Entre los primeros están los receptores activados por proteinasas (PAR), los receptores adrenérgicos, purinérgicos, de tromboxano y serotoninérgicos, entre otros. Entre el segundo grupo destacan por su importancia funcional el receptor del factor de von Willebrand (complejo GPIb-V-IX), el receptor de fibrinógeno ( $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ), el receptor de colágeno ( $\alpha 2\beta 1$ ) y el receptor de vitronectina ( $\alpha \text{V}\beta 3$ ). Estos receptores, con toda probabilidad, actúan de forma concurrente en la activación del receptor de fibrinógeno mediante lo que se conoce como señalización “dentro-fuera”, puesto que las moléculas implicadas actúan sobre el extremo carboxiterminal intracelular de  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  induciendo su cambio conformacional (Shattil *et al.*, 1998). Cualquier mecanismo de activación plaquetaria conduce a la activación del receptor de fibrinógeno, la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  (Figura 2A y B). La relativa abundancia de fibrinógeno soluble y la alta densidad de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  sobre la membrana, determina la formación de numerosos puentes entre plaquetas activadas adyacentes, estabilizando el agregado plaquetario.

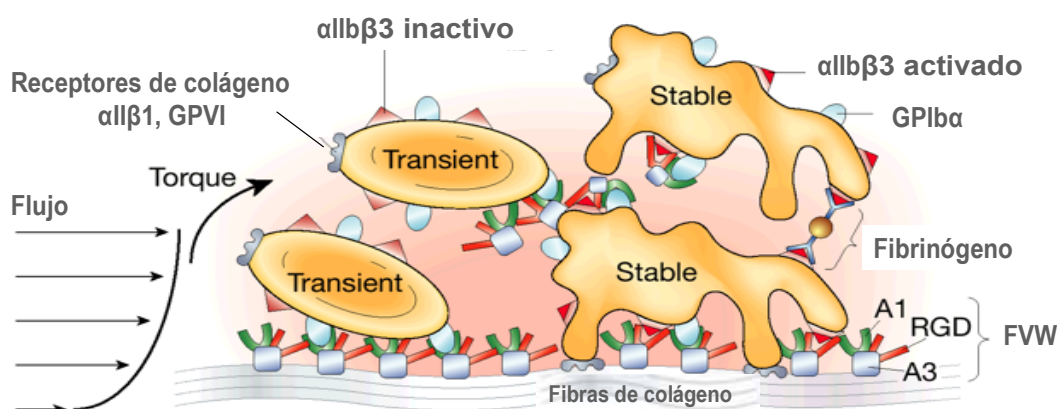
Como hemos mencionado anteriormente, la hemostasia primaria comienza con la adhesión de las plaquetas a las estructuras subendoteliales expuestas. Esta fase se conoce como de anclaje o contacto. Posteriormente se produce la fase de adhesión, en la que las plaquetas van a cubrir el área lesionada; y finalmente, se produce la formación de un tapón plaquetario que facilita la coagulación o hemostasia secundaria, proporcionando el soporte para el ensamblaje y activación de factores de la coagulación, que darán lugar a la retracción y fortalecimiento del coagulo mixto de plaquetas y fibrina.



**Figura 2. Activación plaquetaria. Vías de activación del receptor de fibrinógeno, integrina  $\alpha IIb\beta 3$ .** **A.** Principales vías de activación plaquetaria mediante señalización “dentro-fuera”. **B.** Modulación de la actividad plaquetaria mediada por agonistas. Una vez activada la plaqueta se expone en su superficie el receptor de fibrinógeno, la glicoproteína  $\alpha IIb\beta 3$ . El fibrinógeno circulante reconoce el receptor y liga las plaquetas adyacentes. Antagonistas del receptor pueden inhibir la agregación ocupando el receptor e inhibiendo la fijación de fibrinógeno. (Adaptado de Shlansky-Goldberg. 2002).

El proceso de adhesión se inicia mediante la interacción del factor de Von Willebrand con el receptor plaquetario GPIb-IX, que sirve como anclaje inicial a la zona dañada y permite el reconocimiento y fijación de proteínas adhesivas de la matriz extracelular [colágeno (Col), fibrinógeno (Fg), fibronectina (Fn), laminina (Lan), vitronectina (Vn), o trombospondina (Trb)] (Houdijk y Sixma, 1985; Sakariassen *et al.*, 1979) a sus respectivos receptores ( $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  y  $\alpha IIb\beta_3$ ) (Shattil y Bennett, 1981). En las condiciones de flujo sanguíneo existentes *in vivo* el complejo plaquetario GPIb-IX es el único, tras la fijación del factor de von Willebrand, capaz de fijar plaquetas y, por tanto, permitir la acción de agonistas y otros ligandos de adhesión (Fig. 3).





**Figura 3.** En las condiciones de flujo sanguíneo existentes *in vivo* el complejo plaquetario GPIIb-IX es el único, tras la fijación del factor de von Willebrand, capaz de fijar plaquetas y por tanto, permitir la acción de agonistas y otros ligandos de adhesión. La activación plaquetaria provoca una reorganización del citoesqueleto que conlleva la extensión de las plaquetas sobre el subendotelio. Sobre esta capa adherente inicial, la fijación con alta afinidad de las moléculas bipolares de fibrinógeno da lugar a la agregación plaquetaria y formación del “tapón” que detendrá la hemorragia.

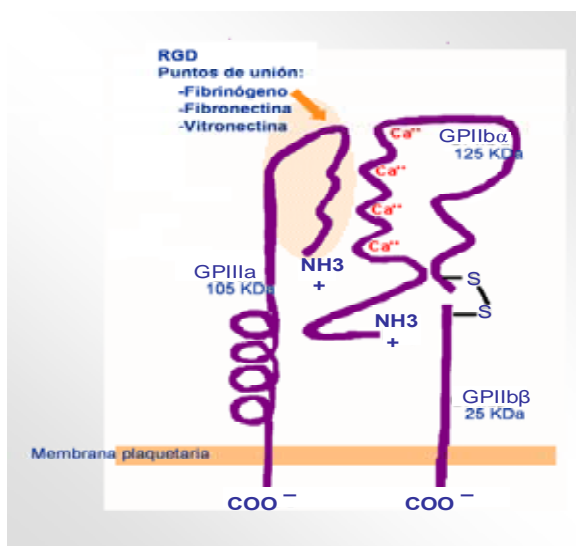
La activación plaquetaria, produce también de forma simultánea secreción de contenidos granulares, entre los que el colágeno, el FvW (activadores) y el ADP potencian el proceso de agregación y reparación de la zona lesionada del endotelio vascular (Hawiger, 1989).

## 1.2. Interacción de plaquetas con endotelio vascular y otros tipos celulares.

Además del reconocimiento y adhesión a ligandos de la matriz extracelular, las plaquetas también se adhieren a células endoteliales, leucocitos, y macrófagos. La hemostasia, trombosis, y arteriosclerosis son considerados procesos en los que las interacciones plaqueta-endotelio desempeñan un papel esencial (Marcus, 1994). En condiciones normales, las plaquetas no se adhieren a la superficie endotelial y se mantiene un flujo sanguíneo normal. Así, por ejemplo, las células endoteliales modulan la reactividad plaquetaria mediante la producción de eicosanoides (metabolitos de la ciclooxigenasa), factor relajante/óxido nítrico; exonucleotidasas, que degradan ADP e inhiben la agregación plaquetaria; trombosmodulina, que fija trombina; sustancias de tipo heparinoide, que sirven de cofactores para antitrombina III (Marcus, 1994), y el activador del plasminógeno tisular, que activa el sistema fibrinolítico. El endotelio también produce factor de von Willebrand que como ya hemos mencionado permite la adhesión de plaquetas en las condiciones de flujo sanguíneo alto *in vivo*. La activación plaquetaria da lugar a la secreción de factor de crecimiento de endotelio vascular (Mohle et al., 1997). En caso de daño endotelial se produce una pérdida de factores de protección, expresión de moléculas de adhesión, mitógenos, y actividades procoagulantes, lo que favorece la agregación plaquetaria, trombosis, proliferación y migración de células endoteliales y musculares lisas, ayudando a la reconstrucción de los vasos afectados.

### 1.3. Estructura y función del receptor de fibrinógeno (integrina $\alpha$ IIb $\beta$ 3).

La integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, es el principal receptor plaquetario de fibrinógeno. Al igual que otras integrinas, es una proteína heterodimérica en la que la interacción entre monómeros no se establece de forma covalente, y que necesita la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  para su conformación activa (Fitzgerald y Phillips, 1985). Esta proteína se expresa únicamente en células del linaje megacariocítico, plaquetas y en algunas células tumorales (Liesveld *et al.*, 1993; Calvete. 2004). Las plaquetas poseen alrededor de 80.000 copias del complejo  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 en la membrana, lo que constituye un 2-3% del total de las proteínas plaquetarias, siendo de las más abundantes en la membrana. La subunidad  $\alpha$ IIb está formada por una cadena pesada (~125 KDa) y una cadena ligera (~25 KDa) unidas a través de un puente disulfuro entre los residuos C826-C880 (Poncz *et al.*, 1987). Posee un total de 18 residuos de cisteína altamente conservados que dan lugar a 9 puentes disulfuro distribuidos a lo largo de toda la proteína. La cadena ligera (GP1IbL) presenta un dominio de transmembrana de 26 aminoácidos y una pequeña cola intracelular. En el extremo aminoterminal de la cadena pesada (GP1IbH) se localizan cuatro sitios de fijación de calcio (Gulino *et al.*, 1992; Bennett, 2005) (Figura 4).



**Figura 4. Estructura de la Glucoproteína  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.** El receptor de fibrinógeno, es una integrina heterodimérica de tipo I, no covalente y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es la proteína más abundante en la superficie plaquetaria (50.000 a 80.000 copias/célula).

La subunidad  $\beta$ 3 (~95 KDa) está formada por 762 aminoácidos, es un polipéptido de cadena sencilla con un único segmento transmembrana de 29 residuos y un corto dominio citosólico (Fitzgerald *et al.*, 1987). El complejo  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, además de fibrinógeno, también reconoce proteínas como el factor de von Willebrand, la vitronectina y la fibronectina (Wright *et al.*, 1993). Diversos estudios han tratado de caracterizar las interacciones moleculares de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 con sus ligandos. Este receptor reconoce dos cortas secuencias lineales en sus ligandos: el péptido RGD presente en gran número de proteínas de adhesión, incluido el fibrinógeno, y el dodecapéptido HHLGGAKQAGDV (H12) presente específicamente en la molécula de fibrinógeno.

El fibrinógeno es una glucoproteína soluble de 340 KDa formada por tres pares de cadenas distintas denominadas  $A\alpha$ ,  $B\beta$ , y  $\gamma$ . El fibrinógeno posee tres posibles sitios de unión a la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ : dos secuencias RGD localizadas en los residuos 95-97 y 572-574 de la cadena  $A\alpha$  y una secuencia de 12 residuos (400-411) localizada en el extremo carboxilo de la cadena  $\gamma$ . Los estudios realizados con moléculas genéticamente modificadas han mostrado que las secuencias RGD no son necesarias para la unión de fibrinógeno soluble a  $\alpha IIb\beta 3$  o para la agregación plaquetaria. Sin embargo los sitios RGD de la cadena  $A\alpha$  parecen tener mayor importancia cuando el fibrinógeno está inmovilizado sobre una superficie o en forma de fibrina (Savage *et al.*, 1995). Por otra parte, el dodecapéptido de la cadena gamma, específicamente los residuos AGDV, son indispensables para la unión de fibrinógeno durante el proceso de agregación (Farrell *et al.*, 1992).

Algunos de los dominios de  $\alpha IIb\beta 3$  implicados en la unión de fibrinógeno han sido localizados en diferentes estudios. La región de  $\beta 3$  D109-E171 está implicada muy probablemente en el reconocimiento del ligando ya que mutaciones puntuales o anticuerpos que reconocen esta región inhiben la unión del ligando (Loftus *et al.*, 1990; Calvete *et al.*, 1991). Esta zona de  $\beta 3$  está muy conservada en las distintas integrinas, sugiriendo que puede ser un sitio de contacto con el ligando común en todas las integrinas. Otra región importante de  $\beta 3$  es la secuencia D217-E220. Mediante péptidos sintéticos o anticuerpos de esta región se puede impedir también la unión del fibrinógeno a  $\alpha IIb\beta 3$  (Charo *et al.*, 1991). También se sabe que el dodecapéptido de la cadena  $\gamma$  (H12) del fibrinógeno y la secuencia RGD parecen unirse a distintos sitios del complejo  $\alpha IIb\beta 3$ . Así, un fragmento recombinante de  $\beta 3$  (274-368) que es capaz de unirse a la región carboxi-terminal de la cadena gamma del fibrinógeno, no lo hace al péptido RGD (Hu *et al.*, 1999; Alemany *et al.*, 1996).

Como ya se ha mencionado, en condiciones basales, la integrina  $\alpha IIb\beta 3$  posee una conformación de baja afinidad por su ligando que le permite unir pequeños péptidos RGD o ligandos inmovilizados, pero no es capaz de fijar proteínas plasmáticas en solución e iniciar procesos de agregación. Se desconoce qué cambios estructurales en  $\alpha IIb\beta 3$  son responsables de los cambios de afinidad por el ligando tras la activación. Sin embargo, observaciones recientes han permitido proponer un modelo, según el cual, en plaquetas en reposo, una región tipo MIDAS de la subunidad  $\beta 3$  estaría tapando el sitio de fijación de ligando en la subunidad  $\alpha IIb$ . Tras la activación plaquetaria se produciría un cambio conformacional en el dominio de  $\beta 3$  que le permitiría, por una parte, exponer su sitio de fijación de ligando y, por otra, cambiar su orientación para dejar expuesto el sitio de fijación en la subunidad  $\alpha IIb$  (Loftus y Liddington, 1997). La fijación de fibrinógeno y otros ligandos al complejo  $\alpha IIb\beta 3$  activado induce cambios conformacionales tanto del ligando como del receptor, que da lugar a la expresión de nuevos epítomos denominados RIBS (sitios de unión inducidos por el receptor) y LIBS (sitios de unión inducidos por el ligando), respectivamente. La exposición de los LIBS ocurre a la vez que se produce un agrupamiento de los receptores en la membrana, seguido de unión de  $\alpha IIb\beta 3$  al citoesqueleto y agregación plaquetaria (Plow *et al.*, 1992).

La importancia y función de la integrina  $\alpha IIb\beta 3$  en la agregación plaquetaria fue identificada por primera vez a través del estudio de pacientes con tromboastenia de Glanzmann, una diátesis

hemorrágica hereditaria que se manifiesta fundamentalmente por hemorragias mucocutáneas. En estos pacientes se observó que las plaquetas eran incapaces de unirse al fibrinógeno y por lo tanto, de agregar. Estudios posteriores han revelado que existen casos que presentan una disminución del número de receptores de fibrinógeno en la superficie de las plaquetas. Se han identificado varias mutaciones que producen cantidades inadecuadas y/o defectuosas del receptor, incapaces de ligar fibrinógeno (Ginsberg *et al.*, 1990; Bennett., 2005). Hasta el momento se han identificado varias mutaciones relacionadas con este desorden genético de carácter autosómico recesivo, algunas de las cuales han sido descritas por nuestro grupo (González-Manchón *et al.*, 2003; Xie, *et al.*, 2005; Jayo *et al.*, 2006).

#### 1.4. Mecanismo de activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ .

La activación de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  es mediada por la transducción de señales a través de la membrana celular en ambas direcciones: señalización “dentro-fuera” (“inside-out”), que regula la afinidad de la integrina por sus ligandos; y señalización “fuera-dentro” (outside-in), que se desencadena tras la fijación del ligando (Hynes 1992; Liu *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2007).

Como ya se ha comentado, en condiciones basales, las plaquetas se encuentran en estado de reposo, presentando un estado de baja afinidad de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  por el fibrinógeno. Los agonistas (trombina, ADP, PAF, adrenalina, etc.), a través de sus receptores de superficie acoplados a proteínas G inducen cambios conformacionales en la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  que permiten exponer sus sitios de unión al fibrinógeno, desencadenando finalmente su fijación con alta afinidad (Sims *et al.*, 1991). Este aumento de afinidad depende de la generación de señales intracelulares propias, señalización “dentro-fuera” (“inside-out”) (Dzamba *et al.*, 2001) (Figura 2ª). Como otras integrinas, la  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  posee regiones intracitoplásmicas relativamente cortas que interactúan con diversas proteínas intracelulares que median su activación (Pasquet *et al.*, 2002). Los dominios citoplasmáticos de las subunidades de la integrina contactan con las proteínas talina y  $\alpha$ -actinina, las cuales a su vez interactúan con otros componentes del citoesqueleto tales como vinculina, paxilina, tensina y actina, que intervienen en la transducción de señales. El papel de la cola citoplasmática de la subunidad  $\beta 3$  de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  tiene un importante papel en la activación de esta integrina a través de su interacción con la talina (Calderwood, 2004; Ma *et al.*, 2007).

La señalización “fuera-dentro” (outside-in) es dependiente del ligando y se activa cuando las plaquetas interactúan con alguno de ellos, influenciando de esta manera una reorganización del citoesqueleto y mediando la adhesión de las plaquetas a la matriz extracelular (Dzamba *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2005). Un suceso temprano en respuesta a la adhesión es la fosforilación de la proteína quinasa de adhesión focal o FAK (Focal Adhesion Kinase) que inicia una cascada de fosforilaciones de otras proteínas como: proteína-tirosina quinasas (Src, Csk), quinasas de serina/treonina (PKC o proteína quinasas C), quinasas de fosfolípidos (PI-3K, PIP-5 quinasas) y posiblemente GTPasas de bajo peso molecular (Ras, Rho). La activación de estas enzimas induce a su vez la activación de otras enzimas (fosfolipasa C, MAP quinasas), lo que finalmente resulta en fenómenos tales como la reorganización del citoesqueleto, inducción de la

expresión de diversos genes y cambios de homeostasis iónica (Leavesley *et al.*, 1993; McNamee *et al.*, 1993; Parson, 1996).

### 1.5. Estructura y función del complejo GPIb-IX-V, receptor del factor de von Willebrand.

El complejo GPIb-IX-V es un receptor que se expresa constitutivamente en la membrana plaquetaria en orden de 25.000 copias/plaqueta, y se compone de cuatro subunidades (Tabla 1) con disposición transmembranar: GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX, y GPV, unidas de forma no covalente con una estequiometría de 2:2:2:1 (Modderman *et al.*, 1992; López *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 2003) (Figura 5). Las cuatro subunidades pertenecen a la superfamilia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (RRL), que participan en numerosos procesos de reconocimiento y señalización celular. En el complejo Gb-IX-V las repeticiones ricas en leucinas tienen una longitud de aproximadamente 24 residuos, pueden estar solas o en tándem, y los extremos amino y carboxiterminales están flanqueados por puentes disulfuro (López, 1994; Kobe y Deisenhofer, 1994; Andrews *et al.*, 1999).

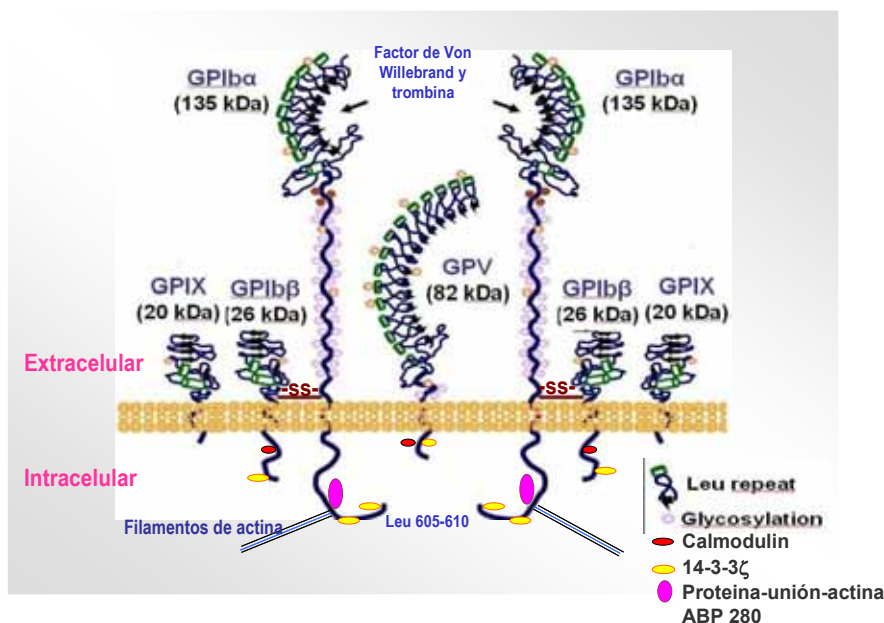
**Tabla 1. Características generales del complejo GPIb-IX-V.**

Subunidad	Marcador	KDa/AA	RR-Leucina	AA citoplasma	Peculiaridades
GPIb $\alpha$	CD42b	135/610	7	96	Región muy polimorfica Sitio de fijación a FvW
GPIb $\beta$	CD42c	25/181	1	34	Unida a GPIb $\alpha$ por -S-S
GPIX	CD42a	22/160	1	5	Se asocia a GPIb 1:1
GPV	CD42d	82/544	15	15	Interacción con GPIb Es sustrato de trombina

Como mencionamos anteriormente, la principal función del complejo GPIb-IX-V es la inmovilización de plaquetas en lugares en los que se produzca un daño vascular mediante la fijación del FvW, favoreciendo así la adhesión temprana y posterior activación plaquetaria (Canobbio *et al.*, 2004). El FvW es un polipéptido de p.m. 230.000 que normalmente se encuentra en la circulación en una conformación no-adherente, formando complejos multiméricos, unidos por puentes disulfuro. En condiciones normales, el FvW circula como un dímero asociado al factor VIII de la coagulación (Bergmeier *et al.*, 2006). Para que se fije a la matriz subendotelial expuesta, el FvW necesita un cambio conformacional que expondría un sitio críptico en el dominio A1, por el cual se une al complejo GPIb-IX-V con alta afinidad (Sakariassen *et al.*, 1979; Berndt *et al.*, 2001). El sitio de fijación del FvW en el complejo GPIb-IX-V se encuentra localizado en los primeros 300 residuos de la región aminoterminal de GPIb $\alpha$ .

Dos regiones comprendidas en este dominio parecen ser importantes para la fijación del FvW: la región aniónica de tirosinas sulfatadas, y las regiones carboxiterminales que flaquean las repeticiones ricas en leucina. Experimentos *in vitro* indican que la inmovilización total de las plaquetas requiere la interacción de FvW con  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , pero no es seguro el significado fisiológico de esta observación (Savage *et al.*, 1996). En cualquier caso, la fijación del FvW parece que podría dar lugar a una activación del complejo  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  que se acompaña de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y de la activación de quinasas, dando lugar finalmente a la agregación plaquetaria (Kroll *et al.*, 1991; Shattil *et al.*, 1994; Mazzucato *et al.*, 2007).

Las regiones citoplásmicas de los componentes del complejo GPIbIX-V no poseen dominios de reconocimiento de proteínas de señalización conocidas. Sin embargo, son capaces de interactuar con proteínas del citoesqueleto. Así, la interacción con la proteína fijadora de actina permite establecer el contacto de GPIb $\alpha$  con la red submembrana filamentosa de actina (Andrews y Fox, 1992; Fox *et al.*, 1988; Hartwig *et al.*, 1991). La comunicación del complejo GPIbIX-V con el citoesqueleto parece tener gran importancia funcional dado que deleciones del extremo carboxiterminal de la GPIb $\alpha$  aumentan la movilidad del complejo GPIb-IX-V y disminuyen la capacidad de fijación del FvW (Dong *et al.*, 1997). Se ha reportado que varias moléculas intracelulares tienen capacidad para asociarse con el dominio citoplásmico del complejo GPIbIX-V. Entre ellas, la molécula de unión a actina-280 que interactúa con la cola citoplasmática de GPIb $\alpha$ ; la calmodulina que interactúa con la zona próxima a la membrana de GPIb $\beta$ ; y la proteína adaptadora 14-3-3 $\zeta$  que se une a GPIb (Dai *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2005). Estas proteínas son mediadores potenciales de la transmisión de señales por el complejo, pero su contribución específica en este proceso todavía no se ha aclarado en su totalidad. En condiciones basales, la mayor parte del receptor de fibrinógeno, la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , se halla unida al citoesqueleto por lo que se habla de la posibilidad de que elementos comunes preensamblados en el citoesqueleto sirvieran para la transmisión de señales desde el complejo GPIbIX-V (Bombeli *et al.*, 1998; Kasirer-Friede *et al.*, 2001). Se ha descrito que el adaptador 14-3-3 $\zeta$  interactúa con el dominio citosólico de GPIb $\alpha$  y GPIb $\beta$ , y hay evidencias que sugieren asimismo una interacción con GPV (Andrews *et al.*, 1998). La interacción con GPIb $\alpha$  es dependiente de un residuo de serina fosforilado (independiente del dominio de unión a ABP). La activación plaquetaria induce la redistribución del 14-3-3 $\zeta$  unido a GPIb $\alpha$  en el citoplasma. Por otra parte, la interacción con la GPIb $\beta$ , también dependiente de la fosforilación de un residuo de serina, parece tener un efecto negativo en la unión GPIb-IX:FvW (Dai *et al.*, 2005). También se ha demostrado la asociación del complejo GPIb-IX:14-3-3 $\zeta$  con la subunidad p85 de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) (Munday *et al.*, 2001).



**Figura 5. Representación esquemática del complejo GPIbIX-V.** En el extremo aminoterminal de la región extracelular de la molécula de GPIb $\alpha$  se encuentra localizado el sitio de reconocimiento del factor de Von Willebrand y de la trombina (modificado de Lanza François. 2006). Se representan también las interacciones intracelulares descritas en el complejo GPIb-V-IX. (Calverley *et al.*, 1998; Andrews *et al.*, 200; Feng *et al.*, 2000; Bodnar *et al.*, 2002; Mangin *et al.*, 2004; Cranmer *et al.*, 2005).

## 1.6. Estructura y función de la trombina.

La trombina es la principal serin-proteasa de la cascada de la coagulación; no se encuentra normalmente en la sangre circulante, sino que se produce a partir de la protrombina (factor II) mediante una reacción catalizada por el factor activado de Stuart (factor Xa) en el paso final de convergencia de las dos vías de coagulación, intrínseca y extrínseca (Lane *et al.*, 2005; Huntington, 2005). La trombina activa tiene un peso molecular de 32 Kd y se produce directamente por la escisión de protrombina entre los aminoácidos Arg271 y Arg320. La trombina está formada por dos cadenas polipeptídicas, una de 36 residuos aminoacídicos (cadena A) y otra de 259 residuos (cadena B) que están unidas entre si por un puente disulfuro (Adams *et al.*, 2006; Vanhoorelbeke *et al.*, 2004). Una vez activada, tiene una forma más o menos esférica, en la que se han identificado tres sitios de interés:

- Un sitio catalítico activo que confiere a la molécula su propiedad de serin-proteasa.
- Dos dominios de reconocimiento, llamados exosito I, reconocido como sitio de unión al fibrinógeno y de varios ligandos y el exosito II, sitio de unión a la heparina. Ambos exositos presentan carácter electropositivo y están localizados en dominios opuestos de la molécula.

La trombina participa en varias reacciones del proceso hemostático. Una de las más destacadas es la conversión del fibrinógeno circulante en monómeros de fibrina, activando además junto con el  $\text{Ca}^{2+}$  el factor XIII o factor estabilizante de fibrina. El factor FXIII activo es capaz de formar puentes covalentes entre los grupos amino y carboxilo de monómeros diferentes de fibrina, otorgando al coágulo mayor resistencia y estabilidad (Figura 6). La actividad transglutaminasa del FXIII no sólo promueve el “cross-linking” de los dominios C del fibrinógeno en la formación de fibrina, sino que además promueve la adhesión del coágulo a las células endoteliales, mecanismo en el que la señalización mediada por integrinas juega un papel importante (Belkin *et al.*, 2005). Otra reacción hemostática en la que participa la trombina es como anticoagulante en el sistema de la trombomodulina, un cofactor presente en la superficie de las células endoteliales (Esmon, 1993). Para dicha actividad la trombina se fija a la trombomodulina, lo cual aumenta notablemente su capacidad para catalizar la activación de la proteína C, frenando así el proceso de coagulación (Mann *et al.*, 2003, Vanhoorelbeke *et al.*, 2004).

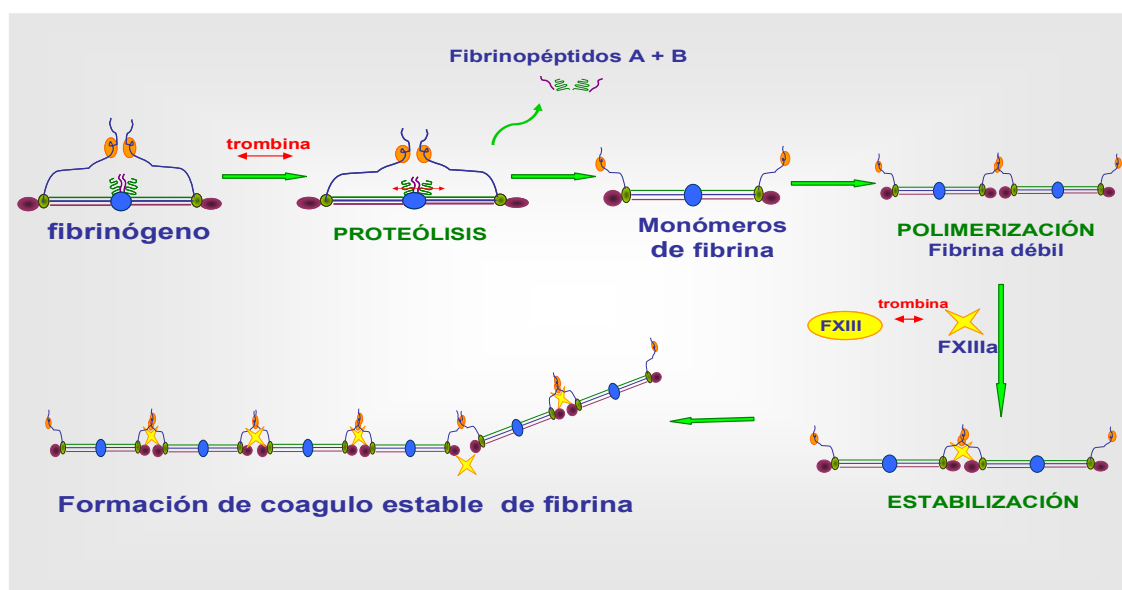


Figura 6. Representación esquemática de la formación de fibrina a partir de fibrinógeno.

La función catalítica de la trombina se ve modulada cuando a los exositos I o II, se unen sus correspondientes ligandos (Lane *et al.*, 2005). La hirudina o el receptor de trombina, es un péptido de 65 aminoácidos (anticoagulante de saliva de sanguijuela) que se une de forma casi irreversible al exosito I de la trombina, inactivándola (Adam *et al.*, 2003) mientras que la trombomodulina, heparina (antitrombina), los glicosaminoglicanos y otras moléculas lo hacen al exosito II (De Cristofaro y Candia, 2003). Cuando la trombomodulina se fija al exosito II, cambia la conformación de la trombina que actúa entonces como factor activador de proteína C e impide la degradación del fibrinógeno a fibrina. (Vanhoorelbeke *et al.*, 2004; Lane *et al.*, 2005). La unión de cualquier ligando a uno de los dos exositos desencadena cambios conformacionales en la proteína, capaz de imposibilitar la unión a ambos exositos, si un ligando se une a un exosito



desplaza el ligando unido al otro; éste mecanismo de exclusión recíproca permite que la trombina regule los mecanismos de coagulación y anticoagulación (Adam *et al* 2003)

Las plaquetas disponen de dos tipos de receptores de trombina:

- Los denominados “receptores activados por proteasas”, PAR-1 y PAR-4, ligados a proteínas G, y activados por la escisión proteolítica de Arg41-Ser42 mediada por trombina.
- El segundo es el complejo glucoprotéico GPIbIX-V y específicamente dentro de dicho complejo la proteína GPIb $\alpha$  (Berndt *et al.*, 1986). Este receptor es de gran interés y sobre la interacción trombina-GPIb-IX-V hemos centrado parte del trabajo experimental presentado en esta memoria.

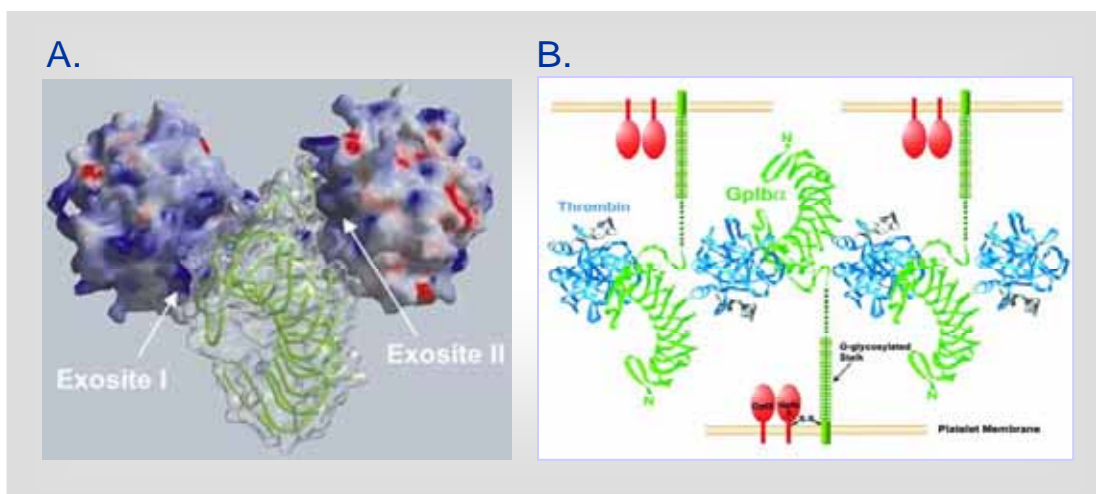
### 1.7. Interacción de la proteína GPIb $\alpha$ con trombina.

La subunidad GPIb $\alpha$  del complejo es un sitio de unión de alta afinidad a la trombina que facilita la activación plaquetaria a bajas concentraciones del agonista (Clemetson *et al.*, 1995). Aunque es bien reconocido que esta interacción es requerida para la activación óptima de la plaqueta (Berndt *et al.*, 1986), el significado biológico exacto y el mecanismo por el cual GPIb $\alpha$  desencadena la activación plaquetaria mediada por trombina no está claro. Esto se debe en parte a la presencia de los receptores PAR-1 y PAR-4 y que son activados por concentraciones bajas y altas de la trombina, respectivamente (Coughlin, 2001).

Recientemente, dos grupos han descrito de forma independiente la estructura cristalográfica del dominio N-terminal de la proteína GPIb $\alpha$  que interacciona con la trombina (Celikel *et al.*, 2003 y Dumas *et al.*, 2003). Los autores demuestran la interacción simultánea de la trombina con los exositos I y II de la trombina, permitiendo el contacto directo de GPIb $\alpha$  con dos moléculas distintas de la trombina (Figura 7), sugiriendo la existencia de un complejo GPIb $\alpha$ -trombina en relación 1:2. Estas interacciones conducirían a la activación de rutas de señalización y a la posterior activación plaquetaria (Celikel *et al.*, 2003 y Dumas *et al.*, 2003).

En estudios donde se han usando plaquetas desensibilizadas para los receptores PAR, eliminado en parte interferencia, se ha llegado a la conclusión de que la trombina, tanto activa como inactiva, induce agregación plaquetaria dependiente de GPIb $\alpha$ . Dicha agregación requiere, además, fibrina polimerizante y desencadena fenómenos de señalización dependientes de GPIb $\alpha$  (Soslau *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2003).

Ramakrishnan y colaboradores en un artículo publicado en el año 2001, propusieron una vía de señalización desencadenada por la unión de trombina catalíticamente inactiva a GPIb $\alpha$  en plaquetas deficientes de GPV. Propusieron que GPV actuaría facilitando la dimerización de GPIb $\alpha$  y amplificando la señal generada por la interacción de GPIb $\alpha$ -trombina, y sugieren que la trombina inmovilizada puede inducir activación plaquetaria dependiente de GPIb $\alpha$ , en la cual el ADP desempeña un papel importante (Adam F. *et al.*, 2003).



**Figura 7.** Representación esquemática de la interacción GPIIb/IIIa-trombina. De acuerdo a la estructura cristalográfica (Celikel y Dumas, 2003), dos moléculas de trombina pueden interaccionar con una de GPIIb/IIIa. A. El diagrama muestra la distribución de cargas en la superficie de la trombina (rojo es negativo, azul positivo). GPIIb/IIIa se muestra en color verde en la superficie transparente. B. Diagrama esquemático de las interacciones GPIIb/IIIa-Trombina entre plaquetas. GPIIb/IIIa y las moléculas de trombina se organizan como estructuras adhesivas (esquemas de Dumas et al., 2003).

Más recientemente se ha demostrado en condiciones de flujo la interacción de la GPIIb/IIIa de las plaquetas con la trombina inmovilizada (Weeterings *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la interacción de la GPIIb/IIIa con la trombina activa diferentes rutas que facilitan la activación de la plaqueta con dosis bajas de trombina.

### 1.8. Macrotrombocitopenia asociada al déficit de GPIIb/IIIa. Síndrome de Bernard Soulier.

El síndrome de macrotrombocitopenia hereditaria, también conocido como síndrome de plaquetas gigantes (GPD, "giant platelet disorder", de la bibliografía en inglés), es un grupo heterogéneo de procesos que se distinguen por cursar con plaquetas anormalmente grandes, trombocitopenia, y tendencia variable a la hemorragia (Perez-Pujol *et al.*, 2003). Algunas de estas enfermedades las resaltamos en la tabla 2 (datos sacados de Balduini *et al.*, 2002; Raccuglia *et al.*, 1971).

Bernard y Soulier (1948) describieron por primera vez el caso de una joven que presentaba un cuadro de hemorragias graves, con tiempo de hemorragia prolongado, trombocitopenia, y plaquetas anormalmente grandes, al cual denominaron "distrofia trombocitaria-hemorrágica congénita". Desde entonces, se han descrito casos similares (Clemetson, 1982; Berndt *et al.*, 2001) con la denominación de síndrome de Bernard Soulier (SBS).

Tabla 2. Síndromes que se acompañan de plaquetas gigantes

Síndrome		Características mas destacadas
Bernard Soulier Descrito en 1948 por Bernard y Soulier		Transmisión autosómica recesiva o dominante macrotrombocitopenia, tiempo de hemorragia prolongado alteración cualitativa o cuantitativa del complejo GPIbIX-V, receptor del factor de von Willebrand
Desordenes relacionados a mutaciones en el gen MYH9.	May-Hegglin	Transmisión autosómica dominante plaquetas grandes, hasta 15nm de diámetro, trombocitopenia, Tiempo de hemorragia prolongado, Inclusiones leucocitarias (Ribosomas, RE, microfilamentos) Desorganización de microtúbulos.
	Fechtner	Nefritis intersticial, sordera, catarata, plaquetas gigantes Inclusiones leucocitarias distintas de May-Hegglin
	Sebastian	Similar a Fechtner, pero sin clínica
Plaquetas grises		Transmisión autosómica dominante (casos esporádicos) macrotrombocitopenia asociadas a tiempo de hemorragia prolongado, falta de gránulos $\alpha$ . Las plaquetas no liberan sus proteínas hemostáticas tales como: vWF, Factores 4 y 5, fibrinógeno, trombospondina, fibronectina, beta-tromboglobulina, inhibidor-1 del activador de plasminógeno.
Plaquetas Montreal Descritas en 1993		Macrotrombocitopenia, agregación espontánea, disminución de agregación inducida por trombina
Trombocitopenias sin tipificar		Macrotrombocitopenias idiopáticas.

Clemetson y Berndt demostraron que el déficit cualitativo y/o cuantitativo de las proteínas que constituyen el complejo GPIbIXV, el receptor de FvW (GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , IX, y V), está asociado a distintos casos de SBS (Clemetson *et al.*, 1982; Berndt, 1983). La herencia del defecto es autosómica recesiva; sin embargo, se ha descrito el caso de una familia en la que la herencia es autosómica dominante (Miller *et al.*, 1992). Los heterocigotos presentan alrededor del 50% de complejo GPIb-IX-V en plaquetas y son asintomáticos. Clínicamente, La macrotrombocitopenia del SBS está asociada a un grupo heterogéneo de mutaciones de las subunidades GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  o GPIX, localizadas en los dominios extracelular o de transmembrana de la proteína, y sin aparente relación con las regiones involucradas en su interacción con el citoesqueleto (López *et al.*, 1998). Algunas de las mutaciones descritas ocasionan grandes defectos del complejo en la superficie plaquetaria e incluso ausencia total del mismo (Di Pumpo *et al.*, 2005; Bergmeier *et al.*, 2006). Otras dan lugar a complejos truncados, carentes del dominio intracelular de GPIb $\alpha\beta$  que no se pueden ensamblar en la membrana plasmática (Kenny *et al.*, 1999). La generación de un modelo de SBS en ratones con anulación del gen GPIb $\alpha$  (Ware *et al.*, 2000) corrobora el papel del complejo GPIb-IX en la formación de plaquetas.

(González-Manchón *et al.*, 2001) describieron un caso de SBS con heterocigosis compuesta del gen GPIb $\alpha$ . Una de las mutaciones identificadas cambia un residuo de cisteína (Cys) por serina (Ser) que anula un puente disulfuro generando una conformación más vulnerable a proteólisis. La otra mutación es una inserción de una base que altera el marco de lectura y genera una proteína truncada incapaz de ensamblarse en la membrana, y que es secretada al medio extracelular. Otro caso de SBS estudiado por este grupo ha permitido identificar una nueva mutación en la subunidad GPIb $\beta$  que, por su localización, podría ayudar a aclarar el papel

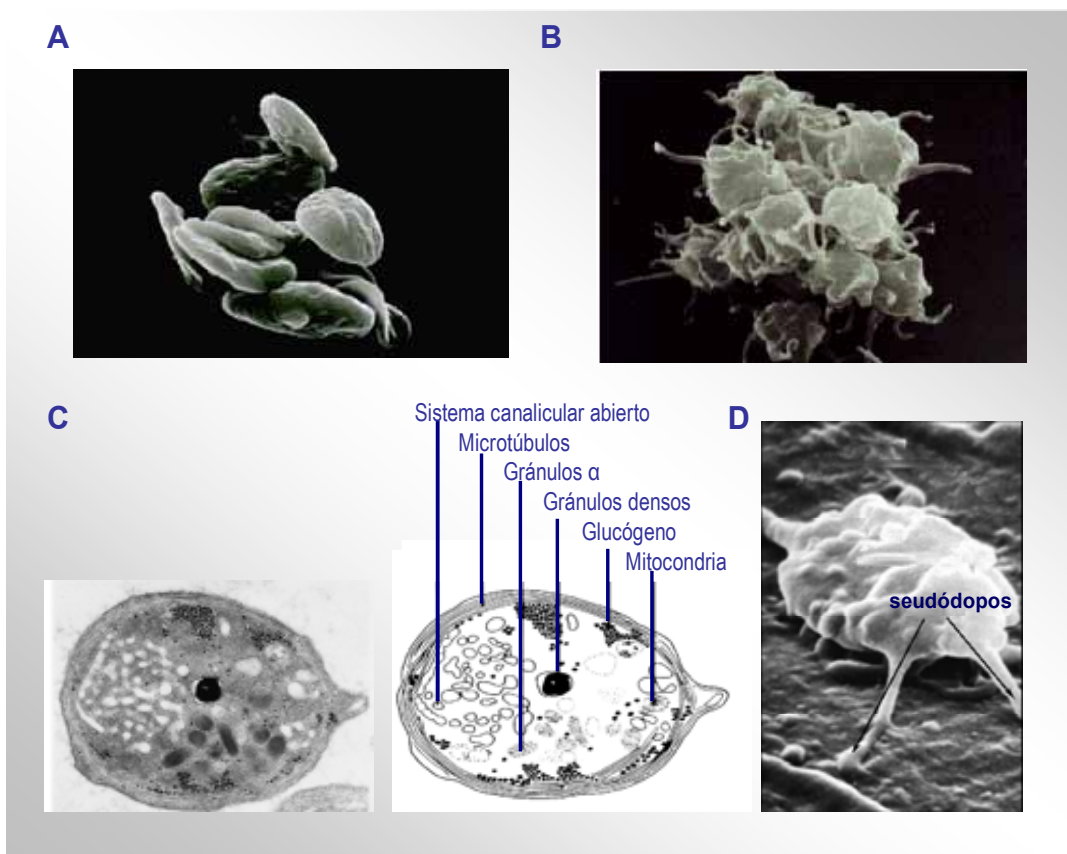
de esta subunidad en la estabilización del complejo en superficie (González-Manchón *et al.*, 2003). En ambos casos fallaría la conexión entre el complejo GPIb-IX y el citoesqueleto. Sin embargo, esta defectuosa asociación membrana-citoesqueleto no explicaría la macrotrombocitopenia asociada a mutaciones de GPIb $\alpha$  que cursan con expresión normal de dicho complejo. Estudios recientes sugieren que la unión de GPIb-IX de membrana al citoesqueleto interviene en la regulación negativa de la fijación de ligando a GPIb-IX (Englund *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta ahora no hay evidencia de que los dominios extracelulares del complejo determinen la asociación del receptor al citoesqueleto. La posibilidad de que la fijación del FvW desempeñe un papel en la producción de plaquetas es improbable dado que los pacientes con enfermedad de von Willebrand (ausencia o deficiencia del factor de von Willebrand) tienen plaquetas normales. Sin embargo, no se puede descartar que, en la médula ósea, la fijación de algún ligando no identificado pudiera estar involucrado en el proceso de liberación de plaquetas. En este sentido, determinados anticuerpos inhiben la formación de plaquetas *in vitro* lo que sugiere que los epítomos reconocidos por estos anticuerpos juegan un papel en dicho proceso (Takahashi *et al.*, 1999). En este sentido apunta también la observación de asociación de macrotrombocitopenia con mutaciones o anulación del gen GATA que regula la transcripción de GPIb $\alpha$  y GPIX (Shivdasani *et al.*, 2001; Nichols *et al.*, 1997).

La ausencia o deficiencia plaquetaria de receptores GPIb-IX-V (receptor de FvW y/o de  $\alpha_2\beta_1$  (receptor de colágeno) no permiten la activación normal de  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , pero se ignora el mecanismo de comunicación entre receptores. De igual forma, se ignora qué otro tipo de elementos reguladores intervienen para determinar la intensidad y calidad de la respuesta plaquetaria así como el mantenimiento de la inactividad en condiciones basales.

### 1.9. Diferenciación megacariocítica y trombocitopoyesis.

Los trombocitos o plaquetas son fragmentos citoplasmáticos anucleados de megacariocitos que circulan en la sangre en forma de disco biconvexo. Giulio Bizzozzero en 1882 fue quien las identificó por primera vez como elementos corpusculares de la sangre y más tarde en 1888 Eberth y Schimmelbusch postularon la implicación de las plaquetas en la formación del tapón hemostático y la trombosis. Estos estudios constituyeron el inicio del conocimiento sobre la función hemostática y fibrinolítica de las plaquetas.

En condiciones normales y en reposo las plaquetas son de forma discoide, tienen un diámetro aproximado de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , un grosor de 0,6 a 1,2  $\mu\text{m}$  y un peso de aproximadamente 10 pg, (Figura 8A). Cuando se activan adoptan forma globular con pseudópodos de hasta 5  $\mu\text{m}$  de largo (George, 2000) (Figura 8B). Morfológicamente se aprecia que la estructura microtubular submembranal se constriñe formando un anillo central que incluye todo el citosol (Figura 8C).

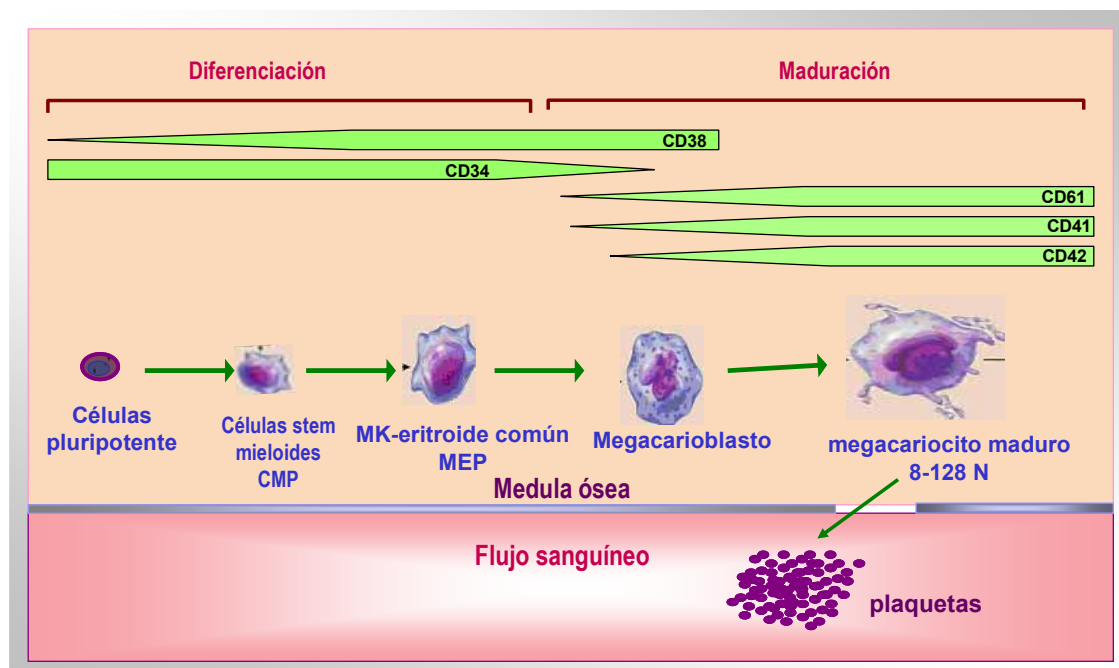


**Figura 8. Fotografías de plaquetas donde se visualiza su morfología.** **A.** microfotografía que muestra la forma discoide de las plaquetas en reposo. **B.** microfotografía de plaquetas activadas iniciando su agregación donde se distinguen las extensiones en forma de pseudópodos **C.** sección de plaqueta en reposo obtenida con microscopio electrónico, donde se señalan los distintos orgánulos subcelulares. **D.** macrofotografía de una plaqueta en proceso de extensión y adhesión.

En sangre periférica de sujetos sanos, el número de plaquetas oscila entre 150 y 350 x 10<sup>6</sup>/mL con una tasa de producción de 5,5 x 10<sup>7</sup> plaquetas al día y una vida media que varía entre 7 y 10 días. Las plaquetas se producen por escisión de la membrana citoplasmática de los megacariocitos durante su fase terminal de diferenciación. En este proceso, los precursores plaquetarios sufren diferentes estadios de maduración que van desde los primeros procesos de proliferación de células progenitoras multipotenciales hasta la diferenciación terminal, caracterizados por la endoreduplicación del material genético (poliploidización nuclear), maduración y expansión de la masa citoplasmática, desarrollo de un sistema de demarcación de membrana, formación del sistema tubular denso, síntesis de gránulos, formación de proplaquetas y su consiguiente liberación (plaquetas) al torrente sanguíneo (Deutsch y Tomer, 2006; Ramasamy, 2004; Battinelli *et al.*, 2001).

La diferenciación de los megacariocitos (MK) y la liberación de plaquetas (megacariocitopoyesis) es un proceso complejo que tiene lugar en la médula ósea y cuya regulación no es del todo conocida. La trombopoyetina (TPO) es un factor de crecimiento esencial en la proliferación y maduración megacariocítica, sin embargo su papel en la producción

de las plaquetas no está totalmente claro (Battinelli *et al.*, 2001; Kaushansky, 2006; Guerriero *et al.* 2006). Las células hematopoyéticas pluripotentes (HSCs) pueden evolucionar a hemangioblastos multipotenciales y dar lugar a progenitores mieloides tempranos (CMP) que a su vez pueden derivar hacia varios linajes (granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos). Los linajes mieloide y megacariocítico derivan de un progenitor MK-eritroide común (MEP) proveniente de un CMP temprano (Deutsch y Tomer, 2006; Szalá *et al.*, 2006) (Figura 9).



**Figura 9. Desarrollo del linaje megacariocítico y producción de plaquetas.**

En el proceso de diferenciación, los MEP progresan hacia el linaje diploide megacariocítico (megacarioblastos). En respuesta a factores ambientales como citoquinas y quimioquinas las MEP bi-potenciales que expresan el antígeno CD34 (gp105-120) pueden diferenciarse hacia el linaje mieloide o al megacariocítico (Szalai *et al.*, 2006). Las MEP que se han diferenciado hacia el linaje megacariocítico disminuyen su capacidad proliferativa a la vez que incrementan la capacidad replicativa de DNA (endoreduplicación) alcanzando niveles de ploidía de hasta 128 N y un tamaño incluso superior a 80  $\mu\text{m}$ , que son rasgos distintivos de megacariocitos maduros formadores de plaquetas (Patel *et al.*, 2005). Otra característica de los megacariocitos es su capacidad de reorganización estructural favoreciendo el desarrollo de invaginaciones membranales que delimitan la distribución de orgánulos y el desarrollo de las denominadas proplaquetas (Hartwig *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2005; Tomer, 2004) (Figura 10).

Entre los cambios morfológicos que sufren las células progenitoras durante la megacariocitopoyesis es de destacar el notable incremento del tamaño celular, el aumento de membranas de demarcación y la expresión de gran número de genes específicos de su linaje,

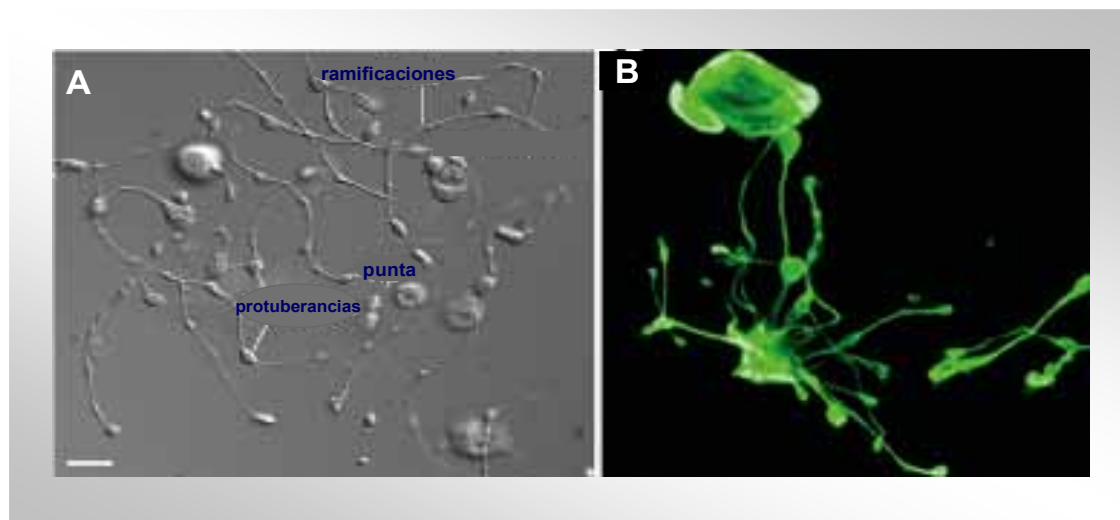
entre ellos los genes tempranos *mpl* que codifican para el receptor de trombopoyetina (TPO), los genes  $\alpha$ IIb y  $\beta$ 3 del receptor del fibrinógeno, que son de los primeros en expresarse en las células CD34<sup>+</sup>; los genes del factor 4 plaquetario (PF4), el de la  $\alpha$ -tromboglobulina, y los del complejo GPIIb-IX-V que forman el receptor del factor de Von Willebrand (FvW). Estos últimos son genes que se expresan en estadios más diferenciados del megacariocito y en las plaquetas ya formadas. De hecho, estas proteínas de membrana se usan como marcadores citoplasmáticos de diferenciación megacariocítica: CD61 (GPIIIa ó  $\beta$ 3); CD41a (Complejo GPIIb/IIIa ó integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3); CD41b (GPIIb ó integrina  $\alpha$ IIb); CD42a (GPIX); CD42b (GPIb $\alpha$ ); CD42c (GPIb $\beta$ ) y CD42d (GPV) (Tomer, 2004; Deutsch y Tomer, 2006) (Figura 5).

Las bases celulares y moleculares del proceso de formación de las plaquetas a partir de los megacariocitos (MKs) no se conoce con precisión, los estudios sobre el tema (Patel *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2005) han demostrado que las proplaquetas (llamadas a las extensiones citoplasmáticas largas hechas por los MKs maduros) son intermedios fundamentales en la biogénesis de las plaquetas. Al parecer los Microtúbulos de los megacariocitos son componentes estructurales esenciales en la extensión de las proplaquetas y serían el mecanismo por el cual las proplaquetas se alargarían y ensamblarían. Los microtúbulos actuarían como “pistas” donde se llevarían los gránulos y demás organelas específicas plaquetarias a los extremos proplaquetarios (Italiano *et al.*, 2007).

Las extensiones de las proplaquetas se asocian a las flexiones y a la bifurcaciones dependiente de actina, que dan lugar a las ramificaciones de los extremos proplaquetarios, en estos extremos se madurarían y disociarían las plaquetas del cuerpo residual de la célula megacariocítica. Este tipo de extremos marginales de microtúbulos de las proplaquetas se han observado en plaquetas maduras, demostrando que la formación terminal de las plaquetas se produciría en los extremos de las denominadas proplaquetas. (Italiano *et al.*, 2007) Se calcula que de cada megacariocito maduro se desprenderían entre 2000 y 5000 nuevas plaquetas (Long *et al.*, 1982).

La falta de fragmentación megacariocítica tiene como consecuencia la escasez de plaquetas y la presencia de plaquetas gigantes en la circulación (macrotrombocitopenia), como se comentó anteriormente. En clínica, la macrotrombocitopenia hereditaria puede presentarse aislada o asociada a un grupo heterogéneo de fenotipos. Muchos de estos desórdenes se asocian a mutaciones de genes que codifican proteínas reguladoras, como el ya mencionado síndrome de Bernard Soulier, asociado al receptor del FvW, el complejo GPIIb-IX-V, o alguna de las subunidades que lo forman. (Caen y Rosa, 1995). Existen modelos murinos donde han generado y rescatado la disfunción en plaquetas, con síndrome de Bernard-Soulier. (Ware *et al.*, 2000; Poujol *et al.*, 2002). En estos casos aunque se conoce el defecto genético asociado, no se ha podido establecer el mecanismo molecular por el que la proteína mutante altera la producción de plaquetas. (Ware *et al.*, 2000).





**Figura 10. Anatomía de las proplaquetas.** **A.** Imagen de contraste de fase de las proplaquetas de megacariocitos de ratón *in vivo*, **B.** inmunofluorescencia de megacariocitos murinos teñidos con anti- $\beta 1$  tubulina distribuido a lo largo de las proplaquetas. Microfotografías sacadas de Patel *et al.*, 2005.

Por otro lado es de destacar también los recientes hallazgos de (Kanaji *et al.*, 2004) donde, en un modelo de ratones transgénicos para una mutante de la proteína GPIb $\alpha$ , se describe el vínculo de la maduración final del megacariocito y los procesos de ploidía con la expresión del complejo GPIb-IX.

### 1.10. Modelos celulares en el estudio de la diferenciación megacariocítica.

El proceso de la diferenciación megacariocítica se asocia a cambios fenotípicos coincidentes con cambios morfológicos, características adhesivas, detención del crecimiento de la célula, endomitosis, y adquisición de marcadores específicos de megacariocitos tales como CD41, CD61, y CD10 (Herrera *et al.*, 1998). El mecanismo preciso de maduración megacariocítica y formación de plaquetas no se conoce bien, debido en parte a la escasez de megacariocitos en la médula ósea y a la falta de modelos experimentales adecuados. Se han usado líneas celulares megacariocitopoyéticas del tipo de las células K562 y las Meg-01, que han ayudado al estudio de los procesos de diferenciación megacariocítica y las rutas de señalización que llevan a este término. Las células leucémicas mieloides humanas K562 muestran un considerable grado de plasticidad en la expresión de propiedades relacionadas a distintos linajes (Tsiffsogto *et al.*, 2003) y pueden diferenciarse en función de los estímulos a los que se sometan: hacia el linaje eritroide, mediante la estimulación con hidroxurea, Ara-C o imatinib (Woessmann *et al.*, 2004) o al linaje megacarioblástico usando el PMA (Racke *et al.*, 2001; Jacques *et al.*, 2003). Estudios recientes sugieren el papel de la ruta MEK/MAPK en la modulación de la diferenciación megacariocítica a través de la activación de la proteína quinasa C (Racke *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2007); proceso comparado con el mecanismo fisiológico que ocurre en la médula en respuesta a una variedad de estímulos (Long *et al.*, 1990).



La familia de PKC abarca por lo menos 11 isotipos clasificados en tres subgrupos según su estructura primaria y de los requerimientos necesarios para su activación: PKCs convencionales (PKC $\alpha$ , PKC $\beta_1$ , PKC $\beta_2$ , and PKC $\gamma$ ) nuevas (PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$ , PKC $\theta$ ; y PKC $\mu$ ) y atípicas (PKC $\zeta$ , PKC $\iota/\lambda$ , (Hofmann, 1997; Racke *et al.*, 2001). Si bien se ha establecido el papel de PKC en la diferenciación megacariocítica de las células K562, la naturaleza de los isotipos de PKC, las vías de señalización que prosiguen a la activación de PKC, y la modulación de la expresión genética seguida a este proceso, no se conocen.

En estudios desarrollados en células K562, donde se induce con PMA la diferenciación megacariocítica, se requiere de una activación prolongada de Erk1/2, mientras que la inhibición de esta ruta y la activación del p38 MAPK probablemente desempeñe un papel que conduciría a la diferenciación eritroide (Huang *et al.*, 2004; Avraham & Price, 1999). En apoyo de este resultado, la activación constitutiva de MAPK en células K562 causa una diferenciación megacariocítica igual a la observada tras tratamientos con PMA (Avraham & Price 1999). La información disponible indica que la activación de Erk1/2 puede ser importante en la diferenciación de las células K562 hacia el linaje megacariocítico, mientras que el papel de otras vías tales como p38 MAPK y JNK no están muy documentadas.

## ***OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS.

El complejo glicoproteico de membrana GPIb-IX, marcador tardío de la diferenciación megacariocítica, desempeña un papel fundamental durante el proceso de activación plaquetaria como ligando del FvW. La interacción de este complejo con la trombina ha sido implicada en procesos de señalización celular, que contribuirían a la activación del receptor del fibrinógeno. Por otra parte, las alteraciones en la expresión de dicho complejo en membrana condiciona la maduración y liberación de plaquetas desde los megacariocitos maduros, lo que determina un fenotipo macrotrombocitopénico en los enfermos con síndrome de Bernard-Soulier.

En este trabajo hemos profundizado en el conocimiento del papel del complejo GPIb-IX en la fisiología y patología plaquetarias, centrándonos en los siguientes objetivos:

1- Estudio de la interacción GPIbIX-trombina y sus consecuencias sobre la activación del receptor del fibrinógeno (integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3).

2- Estudio de las vías de señalización implicadas en la diferenciación del megacariocito y del papel de la expresión del complejo GPIb-IX en la maduración terminal.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. Materiales.

##### 3.1.2. Líneas Celulares.

#### Células CHO

Las células CHO son una línea establecida de ovario de Hámster Chino, estas células se cultivaron en incubador de CO<sub>2</sub>, con medio DMEM (Dulbecco's Modified Tagle medium, Gibco) con 10% de suero fetal bovino (FBS), previamente inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

#### Células K562

Las células K562 son células eritroleucémicas humanas que fueron crecidas en incubador de CO<sub>2</sub>, con medio DMEM, 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomycin.

#### Células Meg-01

Son células leucémicas humanas. Estas células fueron crecidas en suspensión en medio RPMI (Gibco) con (10%) suero fetal previamente inactivado, más 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

##### 3.1.3. Reactivos

#### Anticuerpos

La Tabla 3 describe los anticuerpos monoclonales utilizados en nuestros experimentos junto con su especificidad y procedencia.

Nombre	Especificidad	Origen
713H7	β3	Nuestro laboratorio
701E5	αIIb	Nuestro laboratorio
11E5D6	cadena Aα de Fibrinógeno	Nuestro laboratorio
P37	β3	J.Gonzalez (Inst. Rocasolana. CSIC)
M3	αIIb	J.Gonzalez (Inst. Rocasolana. CSIC)
SZ2	GPIbα (Mouse anti-Human CD42b)	Serotec
SZ1	GPIX / GPIbβ	Beckman Coulter
AK2	GPIbα	Serotec
CD42D	GPV	Santa Cruz Biotechnologies.

fibrinógeno	Fibrinógeno	Calbiochem
FITC-PAC1	Forma activa de $\alpha$ IIb $\beta$ 3	Becton Dickinson
PY99	p-Tyr	Santa Cruz Biotechnologies
Antifosfo-p44/42	p-ERK 1/2	Cell Signaling Danvers
H1AG11	$\beta$ 3	Nuestro laboratorio.
2BC1	$\alpha$ IIb	Nuestro laboratorio.
Anti-p38	p-P38 Thr 180/tyr 182	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-Active JNK pAb Rabbit pTPpY	p-JNK	PROMEGA
Goat IgG conjugado a Alexa 647	Anti Mouse IgG	Bio-Rad
Goat IgG conjugado con HRPP	Anti-Mouse IgG	Bio-Rad
Rabbit IgG F(ab') <sub>2</sub> conjugado con FITC	Anti-Mouse	Dakko
Goat Anti-Rabbit IgG conjugado con HRP	Anti-Rabbit IgG	Bio-Rad

### Inhibidores y otros reactivos.

Nombre	Acción	Procedencia
W7	Inhibidor de calmodulina. Antagonista del metabolismo del calcio	Cell Signaling
Genisteína	Inhibidor de proteínas quinasa (específico de residuos de tyrosina)	Fluka y Sigma
Citocalasina D	Inhibidor de la polimerización de actina	Sigma
TRAP-6	Péptido activador del receptor de trombina	Sigma
RGDS	Inhibidor competitivo de integrinas	Sigma Aldrich
GPRP	Péptido Glicina-Prolina-Arginina-Prolina	Sigma Aldrich
LY 294002	Inhibidor de PI-3 quinasa	Sigma Aldrich
RO 31 8220	Inhibidor de proteína quinasa C	Calbiochem
STA (estaurosporina)	Inhibidor de proteína quinasa C	Roche
BIM 1	Inhibidor de proteína quinasa C	Calbiochem
PD 98059	Inhibidor de MAP quinasa quinasa MEK1	Cell signaling

SB 202190	Inhibidor de actividad de p38 MAP quinasa	Sigma Aldrich
PMA	Activador proteína quinasa C	Sigma Aldrich
U-0126	Inhibidor MEK1	Sigma Aldrich
PP2	Inhibidor de Src familia	Biogen Científica SL
Geneticina (G418)	Antibiótico de selección	Sigma y Boehringer
Trombina	Trombina	Sigma
HOECHST 33342	Tinción de DNA	Invitrogen

Las enzimas de restricción y la ligasa T4 ADN fueron adquiridos en Amersham-Bioscience e Invitrogen. Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos (metanol, glicerol, etanol y cloroformo) fueron suministrados por Merck. Los componentes de los medios de cultivo para bacterias (bacteriotripton, agar y extracto de levaduras) fueron suministrados por Pronadisa y Disco.

Los reactivos de electroforesis, acrilamida, N,N'-metilen-bisacrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS) y  $\beta$ -mercaptoetanol, El N-N'-N'-N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), persulfato de amonio, Amido Black 10B, el marcador de peso molecular "SDS-PAGE Standards, Broad Range" fueron obtenidos de Bio-Rad. Compuestos como ampicilina, agarosa, dimetilsulfóxido (DMSO), seroalbúmina bovina (BSA), lisozima, detergentes Tritón X-100 y Tween-20 e inhibidores de proteasas (fenilmetanosulfonilo (PMSF) fueron también obtenidos de Sigma-Aldrich. La Sefarosa para la purificación de inmunocomplejos fueron adquirida a Amersham-Bioscience y La biotina-NHS utilizada como marcaje, se obtuvo de Sigma.

Para determinar la concentración de proteínas, usamos el método de Bradford con reactivos de la firma Bio-Rad. Los reactivos para el revelado de autorradiografía y las membranas de inmunoblot, PVDF 0,2  $\mu$ m, (inmuno-Blot PVDF Membrane) fueron de Bio-Rad y la película Curix RP2 Plus de AGFA.

Algunos experimentos y preparaciones se realizaron empleando los siguientes juegos de reactivos comerciales: purificación de plásmidos, Maxi Kit JETSART; purificación de bandas de geles, "Extraction spin Kit/50 JETSTAR", suministrado por Genycell Biotech España, S.L. Nucleofección, "Kit V nucleofector", suministrado por Amaxa Biosystems. Lipofectamina, Lipofectamine 2000, suministrado por Invitrogen.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1 Preparación de vectores de expresión.

Los cDNAs silvestres de las proteínas GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX,  $\alpha$ IIb y  $\beta$ 3 fueron clonados en el vector de expresión pcDNA3. Productos de PCR de cada uno de dichos cDNA's fueron clonados en el vector TOPO, cortados con enzimas de restricción y subclonados en el vector de expresión pcDNA3. Con tal fin, los productos de PCR se incubaron con el vector TOPO durante 5 minutos y se procedió a su transformación en células bacterianas competentes. Las células transformadas fueron crecidas en placas con medio LB con ampicilina y algunas colonias crecidas en medio LB líquido para la obtención de cantidades suficientes del plásmido. El tamaño del DNA purificado obtenido se analizó mediante análisis de restricción y fue secuenciado para verificar que el producto de nuestro interés tenía la secuencia correcta. Para la purificación de cantidades suficientes de plásmido se crecieron volúmenes adecuados y las bacterias se trataron con el Kit "Maxi Prep" para la purificación del DNA. Tras evaluar el tamaño en geles de agarosa, se cortó y purificó la banda de DNA de tamaño adecuado y se cuantificó para almacenar hasta la transfección de las células.

### 3.2.2 Purificación de plásmidos.

Para la mayor parte de las aplicaciones, hemos utilizado el método de Morelle para aislar el DNA de plásmido amplificado en cultivos de bacterias. Brevemente, tras inocular 2-10 ml. de medio LB (Luria-Bertani) con un clon de bacteria transformada con el plásmido en cuestión, se incubaba el cultivo con agitación durante 10-16 h a 37°C. Después de sedimentar las bacterias por centrifugación, se lisan tratándolas con lisozima y SDS disuelto en NaOH; a continuación, el DNA cromosómico es precipitado selectivamente. El DNA de plásmido contenido en el sobrenadante, tras ser precipitado con isopropanol, se purifica mediante tratamiento con RNasa y/o extracción con fenol-cloroformo-isoamílico. La concentración de DNA se cuantifica mediante la determinación de la absorción a 260 nm. Para algunas aplicaciones, como la transfección de células eucariotas, cuya eficiencia depende sobre todo de la calidad del DNA, hemos utilizado kits comerciales (Promega) para obtener preparaciones de DNA de plásmido de pureza garantizada.

### 3.2.3. Purificación de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.

Para algunas aplicaciones, el DNA se sometió a electroforesis en geles de agarosa con el fin de aislarlo o garantizar su pureza. Una vez visualizado el fragmento del tamaño adecuado mediante tinción con bromuro de etidio, se corta la banda de agarosa y el DNA puede ser extraído y concentrado por diferentes procedimientos, dependiendo de su tamaño y cantidad. Los métodos más utilizados en este trabajo fueron la electroelución, y la purificación mediante el tratamiento de la agarosa con matrices comerciales que fijan selectivamente ácidos nucleicos (BioRad).



### 3.2.4. Obtención de Transfectantes estables en células CHO, Meg-01 y K562

#### Transfección mediante precipitación con fosfato cálcico

Las células CHO fueron crecidas hasta alcanzar su fase exponencial aproximadamente hasta alcanzar un nivel de confluencia del 70% en platos de cultivo con capacidad para 10ml de medio. Para generar clones de células CHO que expresan de forma estable los complejos proteicos GPIbIX y/o  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 procedimos como se detalla a continuación: Unas 2 horas antes de la transfección se cambió el medio a las células, después se preparó la mezcla de cloruro de calcio 2,5 M con un tampón salino 2X HEBS y el DNA de cada proteína (5-20  $\mu$ g total), se dejó reposar por 20 minutos, tiempo en el que se forman los precipitados de fosfato cálcico y posteriormente se añadió la mezcla a la suspensión celular, se homogenizó bien con el medio en el plato de cultivo y tras 16 horas de incubación a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% y 95% de humedad. Transcurrido este tiempo, se sustituyó el medio de transfección por medio fresco y se incubaron hasta completar 48 horas. Posteriormente las células se lavaron con tampón PBS (1X) y se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco con 400  $\mu$ g/ml de geneticina (G-418) para seleccionar las células que incorporaron el vector de expresión, que son las únicas resistentes al antibiótico. El medio de cultivo con geneticina es cambiado frecuentemente hasta que tras la muerte de las células no resistentes, unos 12-20 días, se detectaron clones aislados resistentes, en los cuales se evaluó mediante citometría de flujo la expresión de proteínas en la superficie celular. Posteriormente los clones fueron seleccionados y clonados por citometría de flujo ("cell sorting").

#### Transfección mediante liposomas (lipofectamina).

Las células K562 y Meg-01, fueron transfectadas con Lipofectamina (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. Las células se crecieron hasta una densidad de  $5 \times 10^5$  células por mL. Para cada transfección se utilizaron  $3 \times 10^6$  células, que fueron lavadas una vez con DMEM sin antibióticos y luego resuspendidas en 3ml de DMEM en una placa de cultivo y mantenidas en reposo por unas horas.

Se prepararon 3  $\mu$ g de ADN de interés en un volumen final de 100  $\mu$ l de DMEM y 15  $\mu$ l de lipofectamina. La mezcla se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadió la mezcla al cultivo celular y se incubaron por un periodo adicional de 5 horas a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Tras 24 horas se cambió el medio y se analizó la expresión en superficie de las proteínas transfectadas, mediante citometría de flujo.

Se continúa con el crecimiento de las células en su medio de selección (medio de cultivo con geneticina) y tras la muerte de las células no resistentes, se evaluó nuevamente la expresión de proteínas en la superficie, mediante citometría de flujo, método por el cual posteriormente se aislaron clones ("cell sorting").

### **Transfección mediante nucleofección.**

Las células Meg 01 y K562 se crecieron exponencialmente hasta una densidad de  $3 \times 10^5$  células por mL para las Meg 01 y de  $6 \times 10^5$  para las K562. En las transfecciones utilizamos  $2 \times 10^6$  células, que fueron lavadas y concentradas por centrifugación. Tras el lavado se mezclaron con 100  $\mu$ l de solución nucleofectora preparada según las indicaciones del fabricante (0,5ml de suplemento para 2,25 ml de solución de nucleofección), se homogenizó vigorosamente y se añadieron 5  $\mu$ g de solución de DNA por reacción. La transfección se llevó a cabo en el Nucleofector de AMAXA usando el programa T-09 (para las Meg-01) y programa T-05 (para las K562). Las células nucleofectadas fueron transferidas a una placa de cultivo con medio completo precalentado donde permanecieron durante 24 horas en incubador de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Transcurrido este tiempo se analizó la eficiencia de transfección mediante inmunotipaje y citometría de flujo, posteriormente iniciamos la selección de clones, adicionando geneticina al medio.

#### **3.2.5. Ensayos de citometría de flujo.**

Los experimentos de citometría de flujo, en sus diferentes aplicaciones, se llevaron a cabo con un citómetro analizador Beckman-Coulter EPICS XL equipado con un láser de argón sintonizado a 488 nm y sistema de lentes para colección de fluorescencia a 525 nm (para fluorocromos como FITC y Alexa 488), y a 620nm (para el Ioduro de propidio). Alternativamente, algunos ensayos analíticos y los de separación celular fueron realizados en un “cell sorter” Becton-Dickinson FACS Vantage equipado con dos láseres y capacidad de excitación con tres líneas: 488nm (para aplicaciones similares a las del analizador), 360 nm (emisión a 420 nm para Hoechst) y 635 nm (emisión a 660 correspondiente al Alexa 647).

#### **3.2.6. Inmunofenotipaje.**

El análisis de antígenos de superficie en los diferentes tipos celulares y en las diferentes condiciones experimentales descritas en este trabajo, se llevaron a cabo mediante marcaje indirecto de las células con los anticuerpos correspondientes y posterior incubación con sueros anti-inmunoglobulina marcados con diferentes fluorocromos (FITC, Alexa 488 y Alexa 647) y posterior análisis con el citómetro de flujo. En el caso de las células CHO que no crecen en suspensión, primero son despegadas de la superficie del plato con 0,5 mM EDTA en PBS y luego resuspendidas a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por 100  $\mu$ l. Las células recolectadas fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo mAb primario específico a una dilución adecuada, en un volumen final de 100  $\mu$ l durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario en las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Acabada la segunda incubación se procedió al lavado de las células con PBS y se resuspendieron en un volumen final de 300  $\mu$ l para ser analizadas por citometría de flujo (cuando fue necesario las muestras fueron sometidas a fijación con paraformaldehído al 1% en PBS y conservadas a 4° C hasta ser analizadas).

### 3.2.7. Marcaje celular con biotina e inmunoprecipitación

En los experimentos indicados las células fueron sometidas a marcaje de superficie con biotina. Para ello aproximadamente  $2 \times 10^6$  células transfectadas de forma estable, se incubaron 30 minutos con 1,25 mM de biotina-NHS (Sigma), se lavaron con PBS y se lisaron en tampón de lisis Tritón (Tris-HCL 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0,05% Tween 20), suplementado con 1mM de fenilmetil-sulfonil-fluoruro (PMSF) y 5  $\mu$ l de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) por cada 100  $\mu$ l de lisado. El material insoluble fue precipitado por centrifugación y el sobrenadante se preincubó con 50  $\mu$ l de una suspensión de proteína A-Sepharosa al 75% con el fin de eliminar proteínas inespecíficas. Tras centrifugar nuevamente, se incubó toda la noche con el anticuerpo específico para inmunoprecipitar, después, se añadió a cada muestra el anticuerpo secundario (antisuero policlonal de conejo) y se prolongó la incubación 90 minutos más. Los inmunocomplejos fueron finalmente, precipitados mediante incubación con proteína A-Sepharose durante 90 minutos y lavados cuatro veces con tampón Tritón (Tris-HCL 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0,05% Tween 20). Las proteínas se eluieron con 50  $\mu$ l de tampón de carga compuesto de TrisCl 50 mM (pH6,8), 10% glicerol, 5% mercaptoetanol, 4% SDS y 0,002% (p/v) azul de bromofenol, se hirvieron por 10 minutos y se separaron en geles SDS-PAGE de gradiente 6-16%. Tras la transferencia a membrana de PVDF, se bloquea con avidina-HRPen por 30 minutos (BioRad) para luego revelar usando un ensayo de quimioluminiscencia.

### 3.2.8. Marcaje de fibrinógeno con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Fibrinógeno humano (Calbiochem) que contiene un 95% de proteína soluble, fue marcado con FITC. Para ello, 2 mg de Fibrigógeno fueron disueltos en 1 ml de PBS, al que se le había ajustado el pH a 9.0 con  $\text{CO}_3\text{Na}$ , la solución se incubó a temperatura ambiente con isotiocianato de fluoresceína (FITC)-Celite a una concentración de 1 mg/ml mezclado frecuentemente por 2 horas. Una vez finalizado el marcaje del fibrinógeno el celite se eliminó tras centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de la reacción que contiene tanto FITC libre como fibrinógeno marcado, se separó pasando la muestra por una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia) equilibrada previamente con PBS pH 7,4 para coleccionar el fibrinógeno marcado. La eficacia del marcaje se determinó midiendo la absorbancia del fibrinógeno-FITC a 495 nm y 280 nm para calcular la relación molar fluoresceína:proteína, según la formula:

$$[\text{Fg-FITC}] = (\text{A}_{280} - \beta \times \text{A}_{495}) / 1,6$$

$$\text{F:P} = 9,8 \times \text{A}_{495} / (\text{A}_{280} - \beta \times \text{A}_{495})$$

Donde 1,6 es el coeficiente de extinción del fibrinógeno a 280 nm, y  $\beta$  es el factor de corrección por la contribución de la fluoresceína a 495 nm, aprox. 0,286. El fibrinógeno marcado se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

### 3.2.9. Ensayos de unión de la fibrina y FITC-PAC-1 a las células.

Las células CHO normales o transfectadas fueron despegadas del plato de cultivo y resuspendidas a una densidad de  $2,5-5 \times 10^5$  células/mL en tampón tyrodes con 2 mM  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , incubadas en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de trombina durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió fibrinógeno marcado (160-1600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o FITC-PAC1 (12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se incubó 20-30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron las células con tampón tyrodes 2mM  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , se centrifugó y resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de buffer tyrodes-calcio para analizarlas por citometría de flujo. Antes del análisis con el citómetro de flujo se inspeccionaron las muestras para detectar los coágulos macroscópicos de fibrina y descartar los agregados de células atrapadas en ellos. En algunos casos, las células fueron preincubadas con heparina, BMP, hirudina o el péptido-mimético RGDS antes de añadir la trombina; En los experimentos indicados, representamos el parámetro “Intensidad de Fluorescencia” como el producto de la media de intensidad de fluorescencia multiplicado por el porcentaje de células positivas, obtenidos ambos directamente del citómetro de flujo.

### 3.2.10. Análisis de proteínas mediante western-blot o tinción con amidoblack.

#### Formación de fibrina polimerizante.

Para promover y analizar la formación de fibrina, mediante la acción de la trombina sobre el fibrinógeno, se incubaron 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fibrinógeno marcado con FITC (Fg-FITC) o sin marcar, con diferentes concentraciones de trombina en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  de buffer Tyrodes (HEPES 5mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  2mM,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  0,3 mM, CLK 3mM, Clna 134 mM,  $\text{CO}_3\text{HNa}$  12 mM, pH 7,4) en presencia de 2mM calcio, la reacción se mantuvo durante 30 minutos, y posteriormente detuvimos la reacción, añadiendo un volumen de 2X laemmli buffer (Tris ClH 125 mM, pH 6,8, SDS al 8%, 10% 2-mercaptoetanol, glicerol al 17%). De esta muestra una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  fue sometida a electroforesis en geles SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) al 10%. En algunos ensayos, la fibrina polimerizante, fue transferida mediante western blot a membranas de PVDF y reveladas con un anticuerpo dirigido contra la cadena  $\text{A}\alpha$  del fibrinógeno. En otros casos la membrana fue teñida directamente con amidoblack.

#### Análisis de extractos celulares

Para el análisis de western blot, se obtuvieron los extractos proteicos solubles mediante lisis de  $3 \times 10^5$  células en tampón 50 mM de Tris ClH, pH 7,4, 150 mM Clna, 1% Triton X-100, 0,05% Tween 20 y suplementados con 1 mM de fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) y 5  $\mu\text{l}$  de cóctel de inhibidores de proteasas (SIGMA) por cada 100  $\mu\text{l}$  de lisado. En algunos ensayos los extractos fueron sometidos a inmunoprecipitación siendo almacenados para este fin a  $-80^\circ\text{C}$  o en nieve carbónica hasta el análisis.

Los extractos celulares totales o inmunoprecipitados, se diluyeron en un volumen igual de tampón Laemmli 2X (125 mM Tris-ClH pH 6,8, 8% SDS, 17% glicerol) se agitaron y se hirvieron

durante 10 minutos. Acto seguido las proteínas se separaron, en condiciones reductoras (10% 2-mercaptoetanol) o no reductoras dependiendo del caso, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE a diferentes porcentajes de acrilamida según el tamaño de la proteína a analizar. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. Tras la transferencia, y para favorecer las uniones específicas y evitar las uniones inespecíficas, las membranas se incubaron 1 hora con albúmina bovina o leche desnatada al 5%, en tampón Tris de lavado (Tris pH 7.5, 10 mM, ClNa 100 mM y 0.1% Tween 20). Una vez se bloquearon las membranas, se incubaron con los anticuerpos correspondientes durante 2 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se lavaron 4 veces con tampón de lavado y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, con una dilución adecuada de anticuerpo secundario en solución de leche desnatada al 1-5%, acto seguido, las membranas se lavaron y, finalmente, se revelaron mediante un ensayo de quimioluminiscencia

### 3.2.11. Identificación de fosfoproteínas

Para determinar el patrón de proteínas totales fosforiladas en tirosina, las células fueron diluidas a una densidad de  $0.5-1 \times 10^6$  células en 50  $\mu$ l de tampón tyrodes y estimuladas a temperatura ambiente con trombina durante diferentes periodos de tiempo. La estimulación de trombina se detuvo añadiendo un volumen igual de tampón Laemli 2X. A continuación se hirvió durante 10 minutos una alícuota del lisado celular y las proteínas se resolvieron en condiciones reductoras en geles SDS-PAGE al 10%. Posteriormente se transfirieron a membrana PVDF, se bloquearon con BSA 5% durante 1 hora, y se trataron con el anticuerpo antifosfotirosina PY99 durante 2 horas. Posteriormente se lavaron las membranas y se incubaron durante 1 hora con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP. Las proteínas fosforiladas en tirosina se visualizaron mediante quimioluminiscencia (ECL).

De forma alternativa también se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-fosfotirosina, para ello se lisaron sobre hielo seco  $3-4 \times 10^6$  células con tampón Nonidet P-40 (50 mM Tris-ClH, pH 7.5, 137 mM ClNa, 1% Nonidet P-40, 10% glicerol) y 5  $\mu$ l de coctel de inhibidores de proteasas. Los lisados fueron preacclarados con Prot A-Sepharosa, y después incubados durante 4 horas a 4 °C con 30  $\mu$ l de anticuerpo antifosfotirosina (4G10) para finalmente ser precipitados con proteína A-Sepharosa durante 90 minutos. Los inmunoprecipitados fueron lavados cuatro veces con tampón Tritón (Tris-HCL 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0,05% Tween 20) y analizados mediante SDS-PAGE en geles del 10%. Finalmente, las proteínas fueron transferidas a membranas, bloqueadas con BSA al 5% e incubadas con otro anticuerpo antifosfotirosina (PY99).

En los ensayos donde se evaluaban las actividades de ERK, P38 o JNK, se lisaron sobre hielo seco  $3-4 \times 10^6$  células con 2X laemmli buffer (Tris ClH 125 mM, pH 6,8, SDS al 8%, 10% 2-mercaptoethanol, glicerol al 17%). Los lisados se guardaron a -80°C hasta su uso o se resolvieron mediante electroforesis en geles del 10%, tras hervir 10 minutos. Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membrana, bloqueadas con BSA al 5% e incubadas con el anticuerpo específico anti-ERK1/2 fosforilado, p38 fosforilado o JNK, para luego

incubar con su respectivo anticuerpo secundario y revelar mediante un ensayo de quimioluminiscencia

### 3.2.12. Análisis del ciclo celular.

El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo tras la tinción de las células con Yoduro de propidio o Hoechst 33341. El primer método se utilizó siempre que no fuera necesaria la determinación de otro parámetro celular que supusiera conservar la integridad celular. El segundo se utilizó cuando fue necesario preservar los componentes proteicos de la membrana, para hacer determinaciones simultáneas del ciclo o estado ploidie de las células más inmunofenotipaje.

#### Ciclo celular mediante Yoduro de Propidio (YP).

La determinación del ciclo celular mediante tinción de ADN con yoduro de propidio se llevó a cabo con  $5 \times 10^5$  células, que fueron lavadas con tampón PBS y resuspendidas mediante agitación en 300  $\mu$ l de una solución de tritón X-100 al 0,5% en PBS. Tras una incubación de 5 minutos se eliminó el sobrenadante por centrifugación. El precipitado se volvió a resuspender en tampón tritón X-100 al 0,5%, 25  $\mu$ g/ml de RNasa (50 Unidades) y 25  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio. Las muestras se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente durante 15-20 minutos para finalmente ser transferidas a hielo hasta su análisis por citometría de flujo. Algunos ensayos se llevaron a cabo fijando las células con etanol al 70% durante una noche a 4° C, tras lo cual fueron lavadas con PBS y resuspendidas en PBS conteniendo 25  $\mu$ g/ml (50 unidades) de RNasa y 25  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio.

#### Doble Marcaje con HOECHST y anticuerpos específicos.

Para valorar el DNA intracelular al mismo tiempo que la expresión en membrana de antígenos de superficie, realizamos un doble marcaje con HOECHST 33342 y anticuerpos específicos para las proteínas que conforman el complejo GPIb-IX-V, para ello se recolectaron  $3 \times 10^5$  células que se lavaron con PBS e incubamos durante 6 horas en medio DMEM sin suero con 2  $\mu$ g/ml de HOECHST a 37 °C. Al finalizar la incubación las células se lavaron 2 veces con PBS y se procedió al marcaje a 4° C con los anticuerpos correspondientes tal como se describe en el apartado inmunofenotipaje. Finalmente las muestras fueron analizadas con el citómetro de flujo.

### 3.2.13. Análisis de la proliferación y viabilidad celular.

#### Proliferación celular por MTT.

La proliferación celular de los cultivos en las condiciones experimentales utilizadas, se determinó mediante conteo directo con cámara de Neubauer y/o empleando el método

colorimétrico del Metil Tetrazolio (MTT) (Sigma). El MTT es una sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) que reacciona con las deshidrogenasas del sistema mitocondrial de células viables dando como resultado cristales de formazán, un compuesto de coloración violeta. Dado que su absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de células viables, se pudo hacer una valoración cuantitativa mediante espectrofotometría. Los ensayos se realizaron cultivando las células en placas de cultivo de 96 pocillos a los que se le añadieron 50  $\mu$ l de una solución 2 mg/ml de MTT por cada pocillo. Tras 3 horas de incubación a 37 °C, en oscuridad, el formazán cristalizado se disolvió con dimetilsulfóxido (DMSO) y se midió la absorbancia a 540 nm de forma automática en un lector de placas (Bio-Tek Instruments, ELX 800).

La viabilidad celular fue estimada mediante dos métodos basados en el análisis por citometría de flujo: exclusión de Yoduro de Propidio y marcaje con Anexina V-FITC para valorar la apoptosis. Ambos métodos fueron utilizados también para la caracterización de las partículas no apoptóticas en los ensayos de producción de plaquetas a partir de células diferenciadas tras diferentes tratamientos.

#### Viabilidad por el método de exclusión de Yoduro de Propidio (YP).

Tras someter las células a tratamientos con los inductores durante 5-7 días, recogimos las células con todo el medio celular y recolectamos por centrifugación tanto para que sedimentaran las células y las partículas. A continuación se marcaron las células/partículas recogidas con los anticuerpos que reconocen las proteínas  $\beta$ 3 y GPIb $\alpha$ , durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente lavamos las células y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con FITC (Alexa 488), tras un último lavado con PBS 1%, se resuspendieron las células en un volumen de 300  $\mu$ l de PBS con 10  $\mu$ g/mL de YP y se determinó la tinción por citometría de flujo.

#### Viabilidad mediante marcaje con Anexina V- FITC.

El marcaje se realizó, básicamente, siguiendo las indicaciones del fabricante del kit (Vybrant # 3, Molecular Probes). Para ello se recolectaron las células tratadas con los diferentes reactivos y tiempos, se lavaron con tampón PBS y se resuspendieron en tampón de unión a anexina (HEPES 50 mM, ClNa 700 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 12,5 mM, pH 7,4) a una densidad de  $\approx 1 \times 10^6$  células/mL, usamos 100  $\mu$ l por reacción. Añadimos 3  $\mu$ l de FITC-anexina V y 1  $\mu$ l de solución de 100  $\mu$ g/mL de yoduro de propidio, se homogenizó e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se añadió el tampón de anexina V hasta un volumen final de 250  $\mu$ l y analizamos la tinción celular por citometría de flujo.

#### 3.2.14. Microscopía de fluorescencia: confocal y epifluorescencia ccd.

Para la realización de este tipo ensayos se crecieron las células en placas de 24 pocillos en los que previamente se había depositado un porta de vidrio circular con el fin de poder manipular

la muestra. Las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por mL en 300  $\mu$ L de medio con un 1% FCS. Tras facilitar la adherencia celular al vidrio durante 2 horas, las células fueron tratadas con estaurosporina 20 nM. En dichas condiciones fueron cultivadas en el incubador a 37 °C durante 3 días. Transcurrido dicho tiempo se lavaron 3 veces con 100  $\mu$ L de PBS, y se sometieron a fijación con paraformaldehído al 4% en PBS por 12 horas. Tras la fijación las muestras se lavaron e incubaron con el anticuerpo primario anti  $\beta 3$  (HIAG11) diluido en PBS (300  $\mu$ L) durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 488) durante 30 minutos a 4 °C Finalmente las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal equipado con excitación multilaser (Leica Microsystems), (excitación 488 nm) y sistema de lentes para colección de la fluorescencia del Alexa 488 (525 nm) y el correspondiente software de análisis de imagen. En los experimentos indicados se utilizó un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan equipado con una Cámara CCD I Leica DFC 350 FX y software de análisis de imagen.

### 3.2.15 Diferenciación megacariocítica con inductores.

Para los experimentos de inducción de la diferenciación megacariocítica se usaron los siguientes reactivos relacionados en la tabla:

Reactivo	Especificidad	Abreviatura
Estaurosporina	Inhibidor de PKC	STA
SB 202190	Inhibidor de actividad de p38 MAP quinasa	SB
PMA	Activador proteína quinasa C	PMA
BIM 1	Inhibidor de proteína quinasa C	BIM 1
H7	Inhibidor de proteína quinasa C	H7
RO 31 8220	Inhibidor de proteína quinasa C	RO
LY 294002	Inhibidor de fosfatidil inositol-3 quinasa, PI3K	LY
PD 98059	Inhibidor de MAP quinasa quinasa MEK1	PD

Las células K562 y Meg-01 se colectaron y se depositaron a una concentración determinada, en pocillos individuales conteniendo medio D-MEM con 1% suero, se dejaron reposar 2 horas y posteriormente se les añadió el tratamiento con los inductores, los análisis de expresión de marcadores se evaluaron a los tres de tratamiento mediante citometría de flujo, con los anticuerpos determinados, en los resultados se reflejan la intensidad de fluorescencia que en general representa el producto del porcentaje de células positivas por el valor del canal medio de fluorescencia de la población correspondiente. En la mayoría de los experimentos esta expresión es verificada mediante western Blot o inmunoprecipitación.



En los ensayos de fosforilación, los reactivos inhibidores se añadieron dos horas antes de añadir los inductores de diferenciación STA, SB 202190 y PMA a las concentraciones determinadas; tras 2, 6 y 24 horas se lisaron las células en tampón Laemmli 2X  $\beta$ -mercaptoetanol y las proteínas se resolvieron en 10% SDS-PAGE. Tras la transferencia y revelado para analizar la fosforilación de ERK1/2, p38 MAPK y JNK, las membranas se tiñeron con amidoblack para descartar que las diferencias en la fosforilación fueran debidas a errores de carga. En los casos de la evaluación de fosforilación a las 2 y 6 horas los errores de carga son mínimos pues se partió del mismo número de células, y que en los lisados procedentes de incubaciones prolongadas (24 y 72 horas) se determinó la concentración de proteínas del lisado así como la expresión de la proteína total.

## ***RESULTADOS***

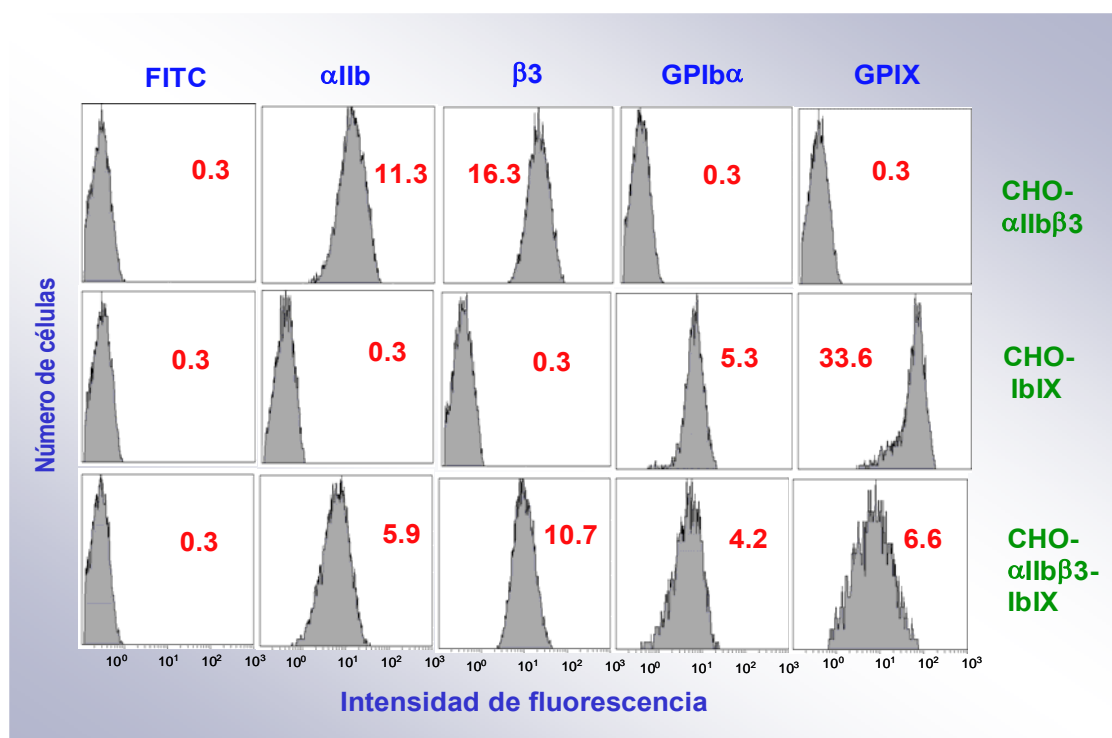
#### 4. RESULTADOS.

##### 4.1. ANÁLISIS DE LAS CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE LA INTERACCIÓN DE TROMBINA CON EL COMPLEJO GPIb-IX EN UN MODELO CELULAR GENERADO EN NUESTRO LABORATORIO.

Con el fin de estudiar con precisión la interacción de los receptores GPIb-IX con  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 hemos generado modelos celulares para eludir la interferencia que supone la simultánea de los agonistas con otros receptores. Concretamente, la trombina en plaquetas es ligando del complejo GPIb-IX y de receptores activados por proteasas (PAR 1 y PAR4) lo que impide tener una visión certera de la contribución en los mecanismos de acción de la trombina. Por tal razón, hemos generado en nuestro laboratorio un modelo celular, en el que reconstituyendo mediante transfección estable los cDNAs de los receptores  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIb-IX, pudiéramos minimizar la contribución de los receptores PAR en los efectos inducidos por la trombina. Para ello hemos utilizado la línea celular CHO, ya que, si bien los receptores PAR no están totalmente ausentes, su contribución en el efecto global inducido por la trombina no interfiere en las condiciones experimentales de este trabajo, y por otra parte, en nuestro laboratorio hemos acumulado experiencia suficiente, para realizar este tipo de estudios en este tipo celular concreto (Larrucea *et al.*, 2002).

##### 4.1.1. Establecimiento de líneas celulares CHO que expresan de forma estable los receptores plaquetarios $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIb-IX.

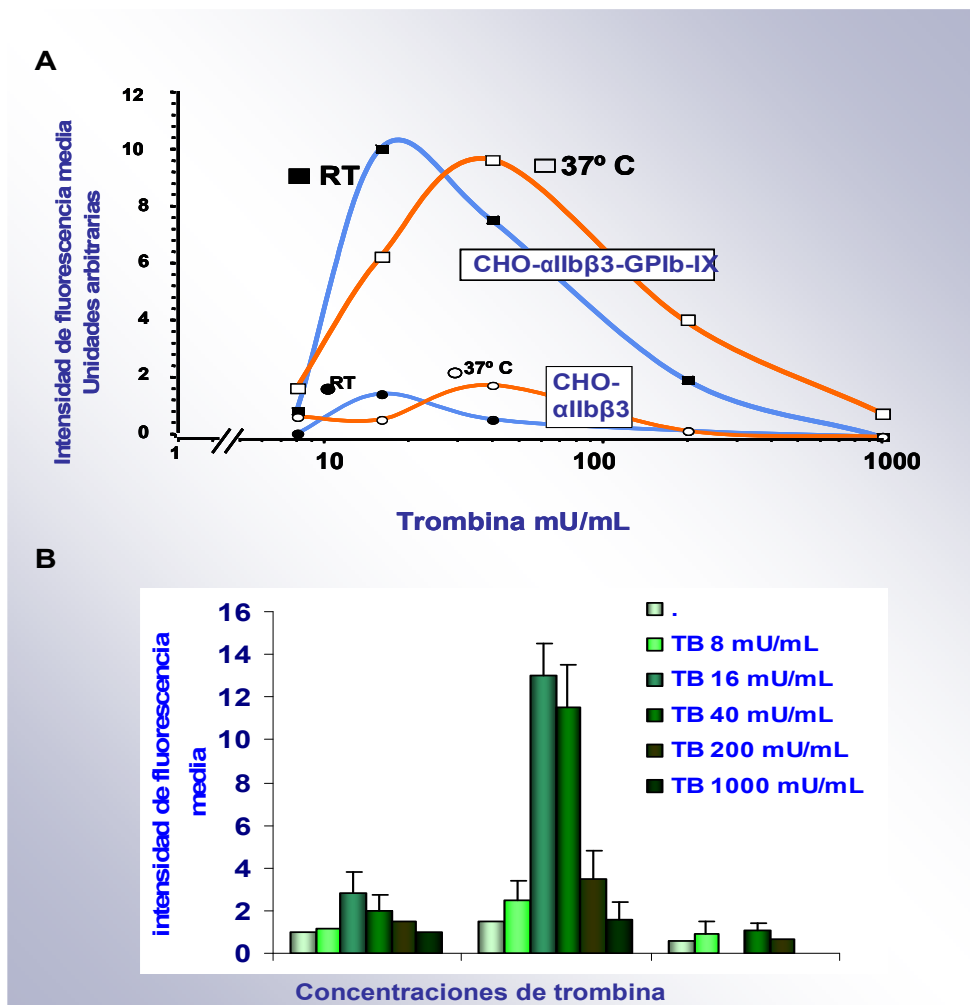
Para generar células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX transfectamos mediante el método de fosfato de calcio, cDNAs que codificaban la secuencia aminoacídica de las proteínas de membrana GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  y GPIX en células CHO que ya expresaban de forma estable los receptores humanos de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3). De los transfectantes estables obtenidos fueron analizados, mediante citometría de flujo y clonados mediante "cell sorting", además se valoraron por inmunoprecipitación las proteínas transfectadas y se seleccionaron los clones que presentaron niveles de expresión de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y de GPIb $\alpha$  similares a los hallados en las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y CHO-IbIX, respectivamente (Figura 11). La expresión del dímero GPIb $\beta$ -IX fue mayor en células CHO-IGPbIX como indican los resultados obtenidos con el anticuerpo monoclonal anti-GPIX (SZ1) de la Figura 10, éste anticuerpo requiere la asociación dimérica con la subunidad GPIb $\beta$  y dado que GPIb $\alpha$  no puede expresarse de forma estable en ausencia de otras subunidades del complejo, la fluorescencia detectada con el mAb anti-GPIb $\alpha$  (AK2) es indicativa de la expresión del complejo total GPIbIX.



**Figura 11. Análisis por citometría de flujo de la expresión de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIb-IX en líneas estables de células CHO.** Detección mediante citometría de flujo, de la expresión en superficie de las proteínas de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mediante el anticuerpo (701E5) que reconoce de forma específica a la subunidad  $\alpha$ IIb y el anticuerpo (713H7) que reconoce específicamente a  $\beta$ 3. Las proteínas del complejo GPIbIX son reconocidas por los anticuerpos (SZ1) que reconoce la proteína GPIX y el (AK2) que reconoce a GPIb $\alpha$  de forma específica. Los números en color rojo corresponden a los valores de los canales medios de fluorescencia

#### 4.1.2. La trombina (TB) induce la fijación de fibrina polimerizante a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX.

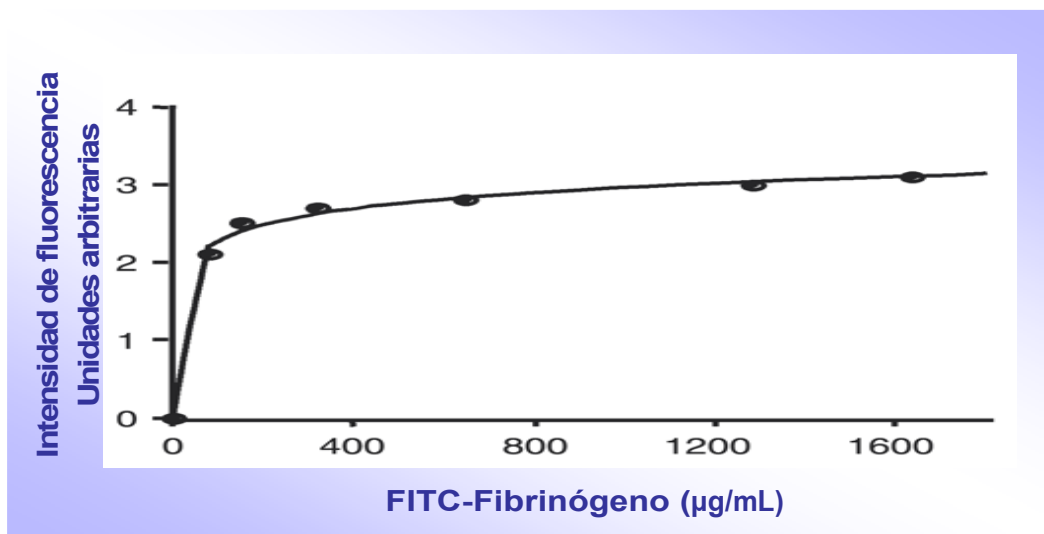
La trombina induce, de forma dependiente de dosis, un incremento de la fijación de fibrina producto de fibrinógeno marcado con el fluoróforo FITC, en la superficie de las células CHO que sobreexpresan establemente los receptores  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIb-IX (CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX) (Figura 12). En estas condiciones experimentales, el coágulo de fibrina-polimerizante comienza a detectarse, macroscópicamente, dentro de un rango de concentraciones de trombina de 10-40 mU/ml. Concentraciones superiores de trombina aceleran la tasa de polimerización de fibrina formando un coágulo y reduciendo en consecuencia su fijación a las células. La diferencia de temperatura a la que se realizó el experimento, 37°C o temperatura ambiente (RT), sólo produjo un pequeño desplazamiento de los valores máximos de actividad de la trombina que no es significativo. En la figura 11, se aprecia que el efecto de la trombina fue considerablemente menor en células que expresaban sólo el receptor de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.



**Figura 12 A)** Efecto de trombina sobre la fijación de fibrinógeno-FITC a células CHO que expresan de forma estable los receptores  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 o ambos  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIIb-IX. Las células CHO o CHO-GPIIbIX se estimularon con concentraciones crecientes de trombina durante 5 minutos, al cabo de los cuales se añadieron 160  $\mu$ g/mL de fibrinógeno-FITC, continuando la incubación durante 30 minutos más a 37 °C o a temperatura ambiente (RT). Tras lavar las células, la fijación de fibrinógeno a las células se determinó por citometría de flujo. **B)** Gráfico de barras en el que se representan el efecto de concentraciones crecientes de trombina sobre los valores de intensidad de fluorescencia media de fijación de fibrinógeno (160 $\mu$ g/mL) a las células. Los datos son medias  $\pm$ SD de cuatro experimentos realizados

Los experimentos de la figura 12, sugieren que los máximos efectos de la trombina sobre la fijación de fibrinógeno a células CHO requieren la presencia simultánea de ambos receptores,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIIbIX y además la fijación de fibrinógeno marcado, en forma de campana demuestra la existencia de un equilibrio de polimerización de fibrinógeno en fibrina y la unión de esta a las células. En nuestras condiciones experimentales, sólo detectamos macroscópicamente la formación de coágulo de fibrina cuando alcanzamos concentraciones de trombina de 16 a 40 mU/mL, Siendo esta última concentración de trombina la óptima en la cual el fenómeno de fijación de fibrinógeno es detectable.

Para comprobar la especificidad de los efectos observados, realizamos experimentos utilizando un rango variable de concentraciones de fibrinógeno. Pudimos apreciar que en presencia de 40 mU/mL de trombina, los incrementos de la concentración de fibrinógeno de 160 a 1600  $\mu$ g/mL, no produjeron incrementos posteriores en la fijación de fibrinógeno a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX (Figura 13), lo que nos sugiere que se trata de un proceso específico.

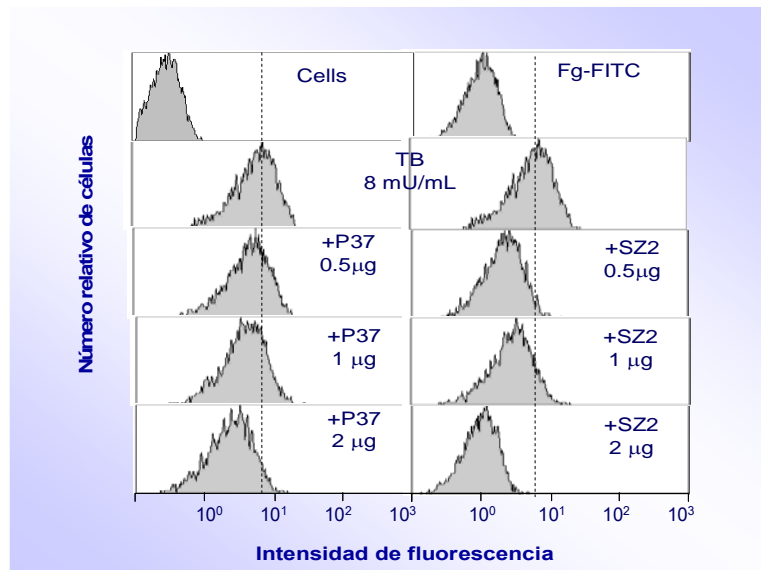


**Figura 13.** Efecto de concentraciones crecientes de Fibrinógeno-FITC sobre la fijación a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX inducida por trombina (40 mU/mL). La fijación inespecífica de fibrinógeno se sustrajo de los valores obtenidos en cada condición restando de estos, los valores obtenidos en presencia de trombina. Los datos son valores medios de tres experimentos independientes.

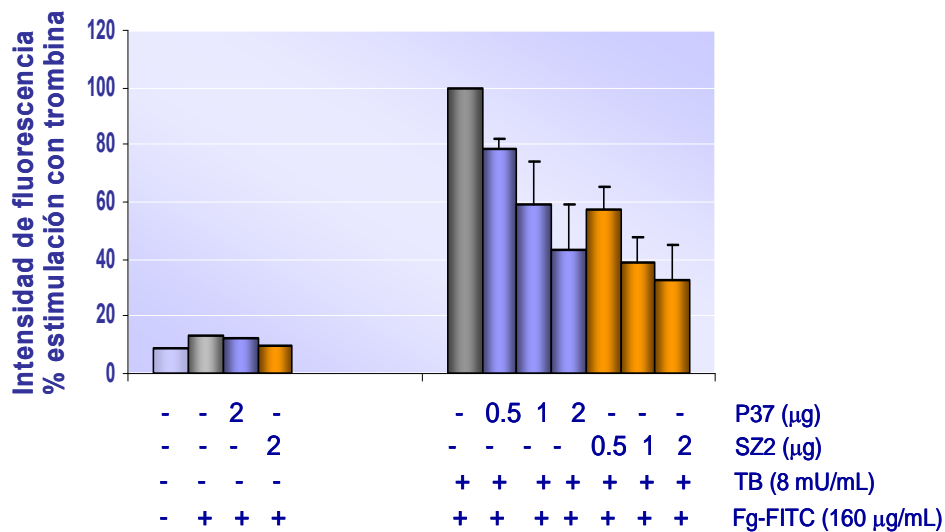
#### 4.1.3. Anticuerpos monoclonales anti-GPIIb $\alpha$ y anti- $\beta$ 3 impiden la fijación de fibrinógeno marcado, inducida por trombina (TB) a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX.

Para confirmar la participación de ambos complejos  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIIb-IX en el efecto de la trombina sobre la fijación de fibrinógeno preincubamos las células 15 minutos con anticuerpos monoclonales específicos (mAb) anti- GPIIb $\alpha$  (SZ2) y anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (P37). SZ2 reconoce la región de GPIIb $\alpha$  que contiene los residuos de tirosina sulfatados involucrados en la fijación de trombina a GPIIb $\alpha$  (Ward *et al.*, 1996). Como se observa en la figura 14A, SZ2 bloquea de forma dosis- dependiente el efecto de la trombina. El anticuerpo anti- $\beta$ 3 (P37) reconoce un epítipo localizado en el dominio 150-216 del extremo aminoterminal de 23 kDa de  $\beta$ 3 e impide la agregación plaquetaria (Ferrer *et al.*, 1998). Cuando incubamos las células con el anticuerpo P37 inhibió de forma dosis-dependiente la fijación de fibrinógeno inducida por trombina (Figura 14); sin embargo, cuando incubamos las células con el mAb M3, un anti- $\alpha$ IIb que no tiene efecto en la agregación plaquetaria (Calzada *et al.*, 2002), no alteró la respuesta en la fijación de fibrinógeno; la presencia de ninguno de estos anticuerpos alteró la fijación de fibrinógeno, según verificamos mediante la formación de coágulo o mediante el análisis tras solubilización de la fibrina polimerizante a partir de fibrinógeno marcado, verificado por electroforesis en geles de poliacrilamida.

A



B.

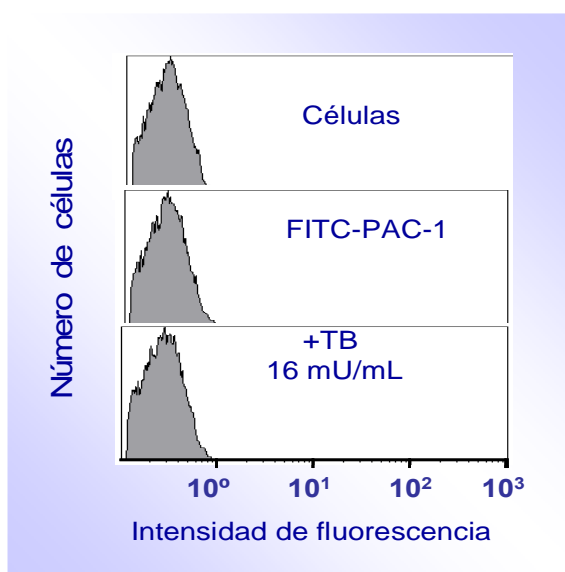


Concentraciones de reactivos / ausencia o presencia de Fg-FITC y Trombina

**Figura 14. Efecto de anticuerpos monoclonales anti-GPIIb $\alpha$  y anti- $\beta$ 3 sobre la fijación de fibrina inducida por trombina a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX.** Incubamos las células en presencia de cantidades crecientes de anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (P37) o anti-GPIIb $\alpha$  (SZ2) durante 15 minutos al cabo de los cuales estimulamos con trombina durante 5 minutos e incubamos 30 minutos más en presencia de 160 μg/mL de FITC-fibrinógeno. Tras un lavado se analizó su fluorescencia mediante citometría de flujo. En el **panel A)** Se muestran histogramas representativos del desplazamiento de la fijación de fibrinógeno analizado por citometría de flujo y en el **panel B)** Se muestra el efecto de trombina representado como porcentaje respecto a la fijación basal de fibrinógeno en ausencia de trombina, siendo los valores medias  $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia de tres experimentos.

#### 4.1.4. Efecto de la trombina en las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIIbIX es mediado por fibrina polimerizante y no por fibrinógeno.

En experimentos donde se han desensibilizado los receptores PAR de las plaquetas, muestran como la trombina no es capaz de activar el receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y fijar fibrinógeno (Dubois *et al.*, 2003). Para estudiar el estado de activación del receptor recombinante  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 en nuestras células CHO, evaluamos si la acción de la trombina era capaz de fijar el anticuerpo monoclonal PAC-1 que reconoce específicamente la forma activa del receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Essex y Li 1999). Como indica la Figura 15, la trombina no produjo efectos detectables sobre la fijación de PAC-1 a células CHO lo que sugiere que el receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 no adoptó una conformación activa, capaz de fijar fibrinógeno.



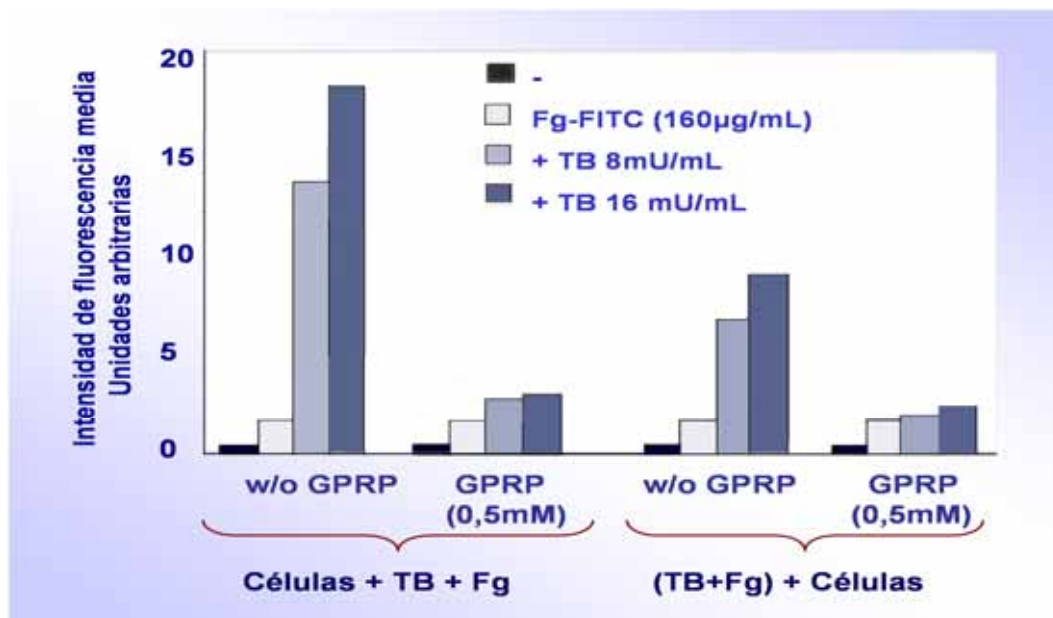
**Figura 15. El efecto estimulador de trombina sobre las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIIbIX, no induce la activación del receptor y la unión de fibrinógeno.** La activación de células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIIbIX por trombina no induce la fijación del anticuerpo monoclonal PAC-1 que sólo reconoce la conformación activa del receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, capaz de fijar fibrinógeno con alta afinidad. Las células fueron estimuladas en presencia o ausencia de trombina y a continuación incubadas por 30 minutos con el anticuerpo PAC-1 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Tras la incubación las células fueron lavadas y analizadas mediante citometría de flujo.

Se ha sugerido que la fibrina podría estar involucrada en la agregación plaquetaria inducida por la acción de trombina sobre el complejo GPIIb-IX (Dubois *et al.*, 2003; Soslau *et al.*, 2001). Por tal razón estudiamos el efecto en el “binding” de fibrina sobre el receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 tras estimular los transfectante con trombina, en presencia de un inhibidor de la polimerización de la fibrina. El péptido GPRP (Glicina-prolina-arginina-prolina) se fija al sitio de polimerización A, que se expone tras la liberación del fibrinopéptido A en la cadena A $\alpha$  de la molécula de fibrinógeno, impidiendo así que progrese el proceso de polimerización. Como se observa en la figura 16, el péptido GPRP que bloquea la polimerización de fibrina inducida por dosis bajas de trombina, inhibió la fijación de fibrina polimerizante a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIIbIX inducida por trombina.

La inversión del orden de adición de reactivos produjo cambios significativos de la respuesta. Cuando el fibrinógeno fue añadido a células preincubadas con trombina se produjeron efectos máximos sobre fijación de fibrinógeno; sin embargo el efecto fue considerablemente menor



cuando ya estaba iniciado el efecto de la trombina sobre generación de fibrina. En ambos casos GPRP inhibió el efecto de la trombina, lo que sugiere que los efectos de trombina podrían ser debidos a la interacción fibrina- $\alpha$ IIb $\beta$ 3. (Figura 16).



**Figura 16.** El péptido Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) bloquea la fijación de fibrina polimerizante a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IX inducida por trombina. En los experimentos de la parte izquierda de la figura (células+trombina+fibrinógeno) el fibrinógeno-FITC se añadió a células preincubadas con trombina durante 5 minutos en presencia o no de GPRP 0.5mM, inhibidor de la polimerización de fibrina. En el panel de la derecha ((trombina+fibrinógeno)+células), las células fueron añadidas a los 10 minutos de mezclar trombina FITC-fibrinógeno en presencia o no de GPRP. A los 30 minutos, las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la fluorescencia. Los datos son medias de tres experimentos.

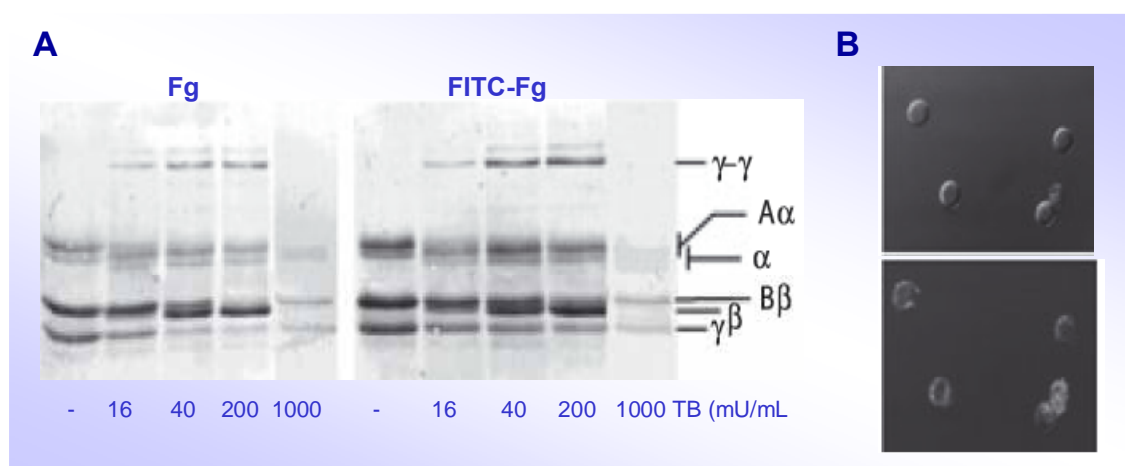
En resumen, la generación de la forma molecular de fibrina polimerizante en presencia de las células, permite la unión de dicha especie química al receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Sin embargo, cuando la formación de dicha especie molecular ya está iniciada, la unión a dicho receptor disminuye.

#### 4.1.5. Evaluación de fibrinógeno marcado con FITC mediante SDS-PAGE.

Nuestros resultados no descartan que los efectos de la trombina fueran debidos a que la conjugación del fibrinógeno con FITC indujera un patrón anormal de polimerización de este al formar fibrina. Estudiamos esta posibilidad analizando mediante SDS-PAGE el patrón de fibrinopéptidos formados y los dímeros generados tras polimerización del fibrinógeno marcado con FITC y sin marcar, tras la incubación con trombina (Figura 17A). Como se muestra en la figura, no pudimos observar efecto diferencial alguno de la trombina sobre el contenido de las cadenas A $\alpha$ , B $\beta$ , and C, ni de los dímeros generados cuando usamos fibrinógeno sin marcar o

fibrinógeno-FITC.

Los preparados comerciales de fibrinógeno suelen contener factor XIII, por lo que en presencia de Calcio y trombina se podrían formar dímeros de cadena C de fibrinógeno. En nuestro caso pudimos detectar pequeñas cantidades de dímeros de cadena C tanto en fibrinógeno normal como el marcado con FITC. La Figura 17 B muestra el estudio de la fijación de fibrina a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX mediante microscopía de fluorescencia, como se puede apreciar la fluorescencia de las células es propio demostrándose que la fijación detectada se produce sobre células individuales y no es un fenómeno de atrapamiento inespecífico de las células en el clot de fibrina.



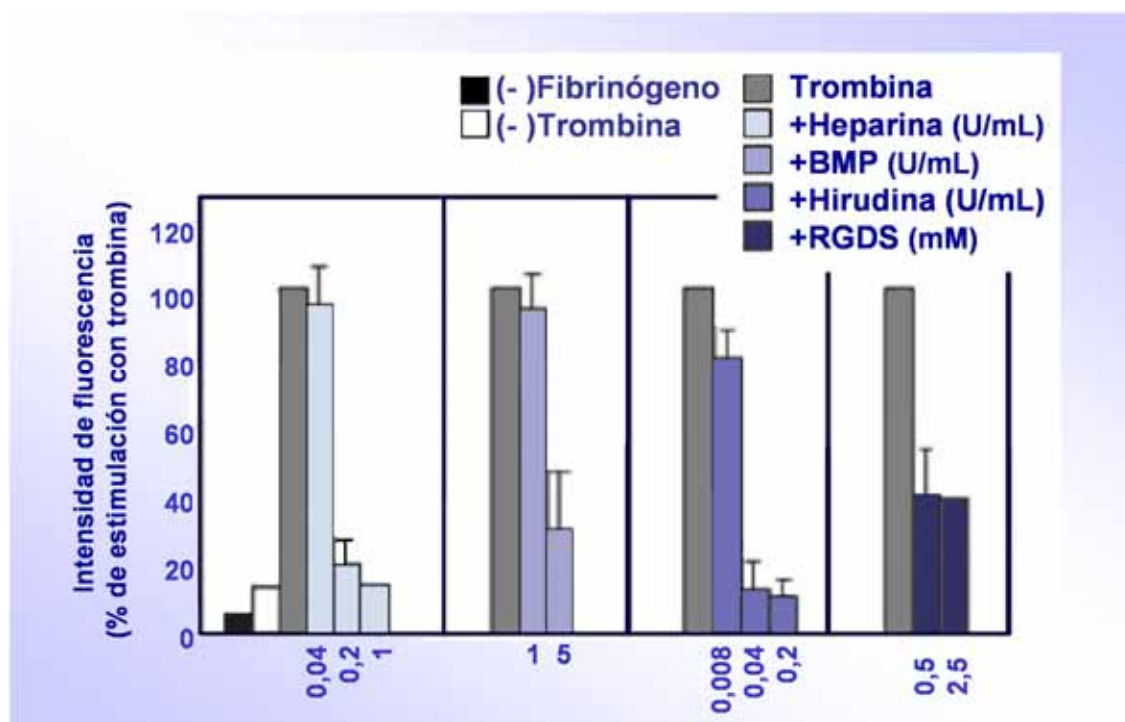
**Figura 17. Análisis mediante SDS-PAGE de los productos de digestión y polimerización de fibrinógeno marcado con FITC o sin marcar (control) tras el tratamiento con trombina.** El fibrinógeno o fibrinógeno-FITC (200  $\mu$ g/mL) se incubó con concentraciones crecientes de trombina durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón con calcio 2 mM. **A.** Los productos de reacción fueron analizados mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% como se describe en materiales y métodos. **B.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de fijación de fibrina-FITC a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX. Las células fueron estimuladas con 40 mU/mL de trombina durante 5 minutos al cabo de los cuales se añadieron 160  $\mu$ g/mL de fibrinógeno-FITC y se incubaron durante 30 minutos, al cabo de los cuales se lavaron y visualizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan (Göttingen, Alemania) equipado con equipo de fotografía digital. Aumento original x 400.

#### 4.1.6. El exositos II de la trombina (TB) participa en la interacción trombina- GPIIb $\alpha$ , y la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) participa en la interacción $\alpha$ IIb $\beta$ 3-fibrina.

Aunque existen datos bioquímicos, funcionales y estructurales que sugieren que los exositos I (FRS o sitio de reconocimiento del fibrinógeno) y II (HBS o sitio de fijación de la heparina) de la trombina están involucrados en su interacción con GPIIb $\alpha$  (Vanhoorelbeke *et al.*, 2004), la naturaleza de dicha interacción no se conoce con precisión. Tampoco se sabe si la región de los

residuos de tirosina sulfatados de GPIb $\alpha$  participa en la interacción con ambos exositos de la trombina (Celikel *et al.*, 2003; Dumas *et al.*, 2003).

Para caracterizar la interacción trombina–GPIb–IX estudiamos los efectos de la hirudina que se une al exosito I y de la heparina sobre la fijación de fibrina a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX inducida por trombina. Nuestros resultados indican que la fijación de fibrina inducida por 16 mU/mL de trombina fue totalmente bloqueada por hirudina. También pudimos observar que el efecto inhibitor de la hirudina corre paralelo con su capacidad de impedir la conversión de fibrinógeno en fibrina; sin embargo, heparinas de bajo o alto peso molecular impidieron el efecto de la trombina en condiciones en las que la coagulación de fibrina no se altera (Figura 18).



**Figura 18.** Efecto de los agentes antitrombóticos heparina y hirudina que reconocen respectivamente los exositos I y II, y del péptido RGDS sobre la fijación de fibrina a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX inducida por trombina. Se incubaron células con trombina (16 mU/mL) durante 5 minutos en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de heparinas de alto o bajo peso molecular. La hirudina y el péptido RGDS se añadieron a células preincubadas con trombina durante 2-5 min. Tras los inhibidores añadimos 160  $\mu$ g/mL de fibrinógeno marcado con isotiocianato de fluoresceína (fibrinógeno-FITC) continuando la incubación durante 30 minutos más. Las barras en negro representan las células incubadas en ausencia de fibrinógeno-FITC y las no rellenas células que no fueron estimuladas con trombina. Los datos son valores medios  $\pm$ SD de al menos tres experimentos y está expresados como porcentaje del efecto de trombina.

La heparina, que se une al exosito II de la trombina, no impide en nuestras condiciones experimentales la formación de fibrina, pues para que ejerza su actividad anticoagulante se requiere la presencia de la antitrombina, cofactor plasmático. Por tanto, la ausencia de fijación de fibrina a las células en presencia de heparina sugiere que el exosito II de la trombina está

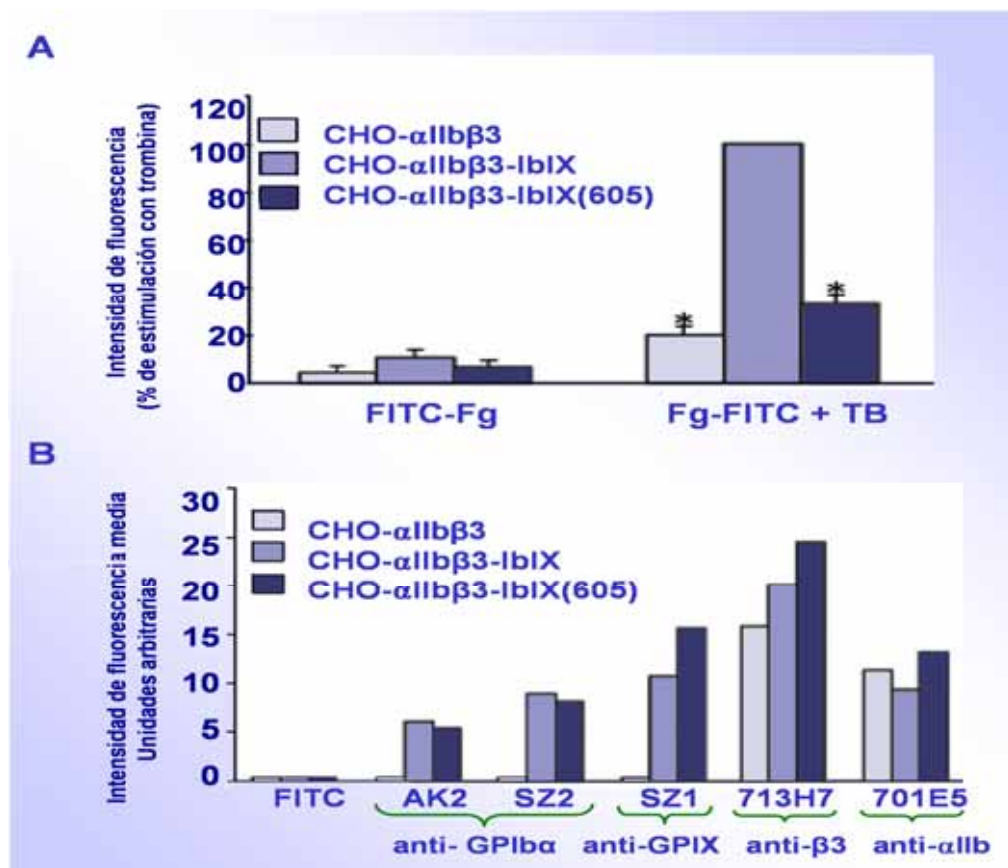
involucrado en la interacción trombina-GPIb $\alpha$ , que desencadena la fijación de fibrina a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX. Nuestros resultados están de acuerdo con la descripción previa de que  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 reconoce tanto fibrinógeno como fibrina a través de secuencias RGD (arginina-glicina-aspartato). En efecto, pudimos observar que el péptido sintético RGDS bloquea el efecto de la trombina sobre la fijación de fibrinógeno a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX, (Figura 18), esta observación apoya el papel de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.

#### **4.1.7. Factores que pudieran intervenir en los procesos de señalización intracelular inducidos por trombina en células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX.**

Calverley y colaboradores describieron en 1998 que la proteína 14.3.3 $\zeta$  se fijaba a dominios intracelulares de GPIb $\alpha$ , ésta interacción se ve implicada en vías de señalización mediadas por el complejo GPIb-IX (Feng *et al.*, 1999; Bialkowska *et al.*, 2003; Kanaji *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2005) por lo que consideramos de interés analizar si esta interacción pudiera estar involucrada en el efecto de la trombina. Con tal motivo generamos células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX(605) que expresaron además de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 una forma truncada de GPIb $\alpha$ , la proteína truncada fue generada por delección de cinco residuos del extremo citoplásmico carboxiterminal, la proteína GPIb $\alpha$  con esta delección, no es capaz de interaccionar con la proteína 14.3.3 $\zeta$ . Utilizando la técnica del doble híbrido en levaduras, pudimos verificar que, efectivamente, dicha forma mutante no era capaz de reconocer a la proteína 14-3-3 $\zeta$  (datos obtenidos en nuestro laboratorio, no publicados). La proteína 14-3-3 $\zeta$  es una proteína adaptadora que muy posiblemente desempeñe un papel fundamental tanto en la unión del complejo GPIbIX al citoesqueleto, como en los procesos de señalización intracelular (Dai *et al.*, 2005). Los experimentos realizados con las células portadoras de la mutación, nos permitieron comprobar que con niveles de expresión del complejo GPIb-IX semejantes a las células normales, la respuesta a trombina es considerablemente menor en las células con la forma mutante (Figuras 19 A y B).

#### **4.1.8. La fijación de fibrina a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIb-IX inducida por la trombina dependiente de calmodulina.**

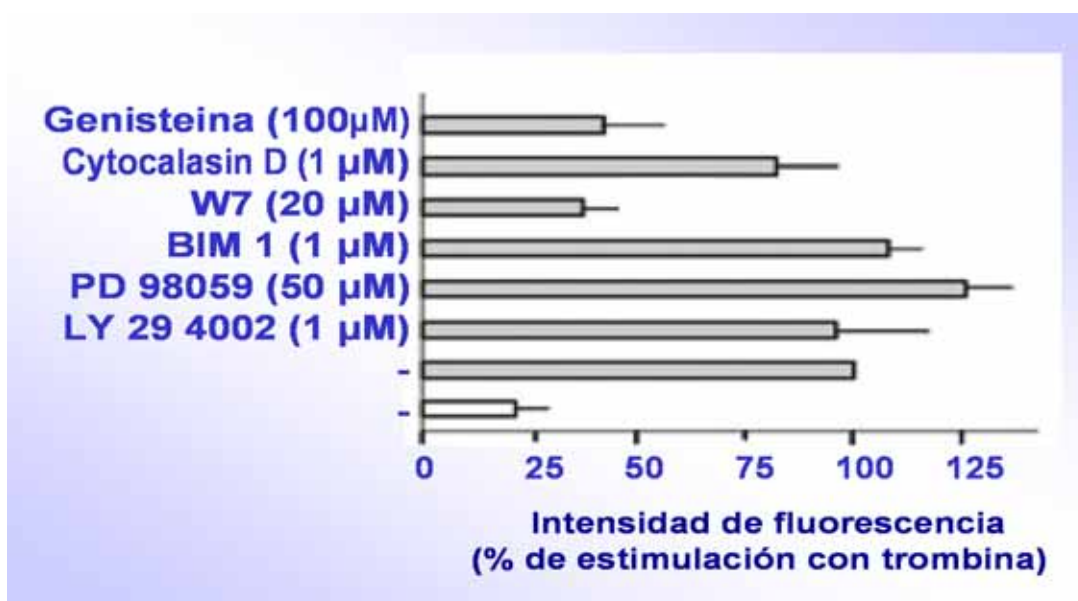
Con el fin de dilucidar la ruta de señalización intracelular involucrada en la activación celular mediada por trombina, realizamos experimentos en los que las células fueron preincubadas de 10-30 minutos con diferentes inhibidores específicos; se utilizaron los siguientes reactivos: genisteína (inhibidor de la fosforilación en tirosina); citocalasina D (inhibidor de la polimerización de actina); W-7 (antagonista de calmodulina); Bisindolylmaleimide I, BIM I, (inhibidor de proteína quinase C); PD 98059 (inhibidor de MAP quinasa quinasa) y LY 294002 (inhibidor de PI-3 quinasa). Posteriormente determinamos la fijación de fibrina polimerizada a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIb-IX, para determinar si se veía inhibida la fijación de fibrina tras la acción de los inhibidores.



**Figura 19.** La delección de cinco residuos del extremo carboxiterminal de la subunidad GPIIb genera una proteína truncada incapaz de responder a trombina fijando fibrinógeno a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX. **A)** Análisis por citometría de flujo del efecto de trombina sobre la fijación de fibrinógeno-FITC polimerizado (fibrina) a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX. Las células fueron estimuladas con 40 mU/mL de trombina durante 5 minutos al cabo de lo cuales añadimos fibrinógeno-FITC (160  $\mu$ g/ mL) y se incubaron 30 minutos más. Tras un lavado, evaluamos la fijación de fibrina a las células. Para calcular los valores de fluorescencia se obtiene el producto del porcentaje de células positivas multiplicadas por su canal medio de intensidad de fluorescencia, el valor 100 % fue arbitrariamente asignado al obtenido en las células GPIIb-IX de fenotipo salvaje. Las cifras son valores de medias  $\pm$ SD de tres experimentos. **B)** Expresión superficial de complejos GPIIb-IX y  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 en las células transfectadas establemente usadas en los experimentos de la figura A. La presencia de GPIIb $\alpha$ , GPIIX,  $\beta$ 3 y  $\alpha$ IIb se determinó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos, tal como se describe en materiales y métodos.

Encontramos una reducción significativa de la fijación de fibrina inducida por trombina cuando incubamos las células con genisteína (inhibidor de proteínas quinasas), cuando incubamos con los inhibidores de proteína quinasa C (BIM 1), de MAP quinasa quinasa (PD 98059) e inhibidor de PI-3 quinasa (LY 294002) se produjeron cambios discretos y cuando usamos el antagonista del metabolismo del calcio, inhibidor de calmodulina (W-7) se produjo una inhibición significativa sobre el efecto de la trombina, bloqueando la fijación de fibrina a las células, sin que se viera impedida la polimerización y formación del coagulo de fibrina. Estos datos sugieren que la interacción trombina-GPIIb $\alpha$  activa una ruta de señalización dependiente

de calmodulina que conduce a la fijación de fibrina a las células (Figura 20). Como vemos en la misma figura, el efecto de la citocalasina D (inhibidor de polimerización de actina) tiene un pequeño efecto en la inhibición de fijación celular de fibrinógeno FITC mediado por trombina, esto puede argumentar el papel inhibitor de la proteína adaptadora 14-3-3 $\zeta$  que hemos argumentado en la introducción y que se menciona en el apartado 4.1.7. Cabe resaltar que la activación plaquetaria induce la redistribución del 14-3-3 $\zeta$  unido a GPIb $\alpha$  en el citoplasma y al igual que la 14-3-3 $\zeta$ , la calmodulina es también redistribuida en el citoesqueleto tras la estimulación plaquetaria (Andrews *et al*, 2001).

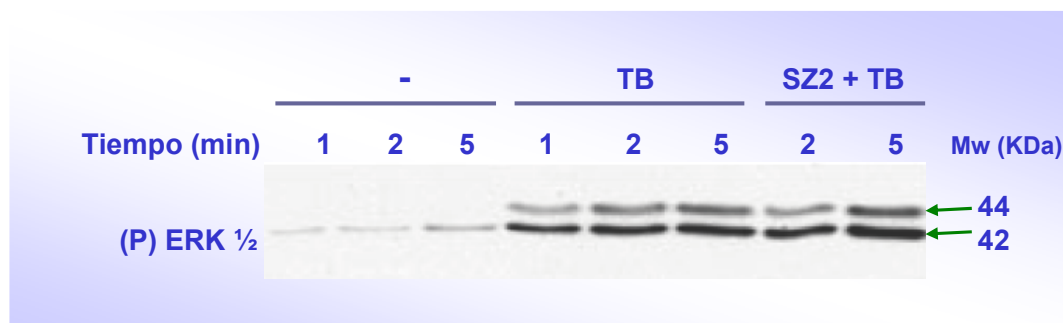


**Figura 20. Efecto de distintos inhibidores sobre el efecto de trombina y la fijación celular de fibrinógeno-FITC.** Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en presencia o ausencia de inhibidores (genisteina, inhibidor de tirosina protein-quinasas; citocalasina D, inhibidor de polimerización de actin; W7, antagonista de calmodulina; Bisindolylmaleimide I, BIM1, inhibidor de proteína quinase C; PD98059, inhibidor de MAP quinasa; LY294002, inhibidor de fosfoinositol 3-quinasa). Posteriormente se estimularon durante 5 minutos con 16 mU/mL de trombina al cabo de los cuales se añadió 160  $\mu$ g/ mL de fibrinógeno-FITC, continuando la incubación 30 minutos más a temperatura ambiente. Las barras sin rellenar representan células incubadas con fibrinógeno-FITC en ausencia de trombina. Los valores de fluorescencia se calcularon como el producto del porcentaje de células positivas y el valor medio de intensidad de fluorescencia y fueron expresados como porcentaje del efecto de trombina (medias $\pm$ SD de tres experimentos).

Se ha sugerido que en plaquetas la fosforilación de Erk1/2 podría estar involucrada en la señalización inducida por la interacción de trombina-GPIb-IX (Dubois *et al*, 2003), por tal razón estudiamos si este pudiera ser el caso en nuestro modelo experimental. En la figura 21, se observa que la estimulación de trombina produjo un incremento de la fosforilación de Erk1/2; no obstante, no parece que el efecto pudiera estar mediado por GPIb-IX dado que el efecto no fue bloqueado por el anticuerpo SZ2 y además pudo ser detectado en células carentes de complejo



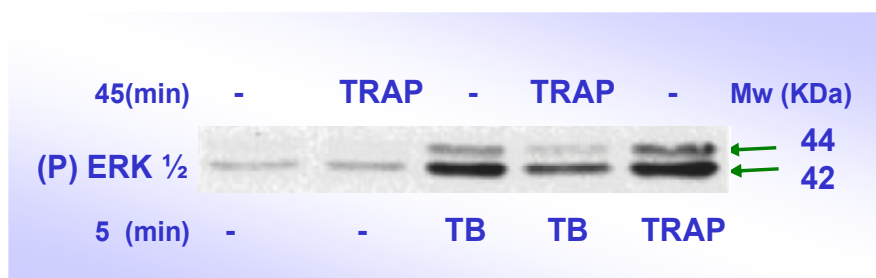
GPIIb-IX. Estos resultados son acordes con la falta de inhibición del efecto de trombina que observamos con el inhibidor específico de MEK-1 PD98059, como se mostró en la Figura 19.



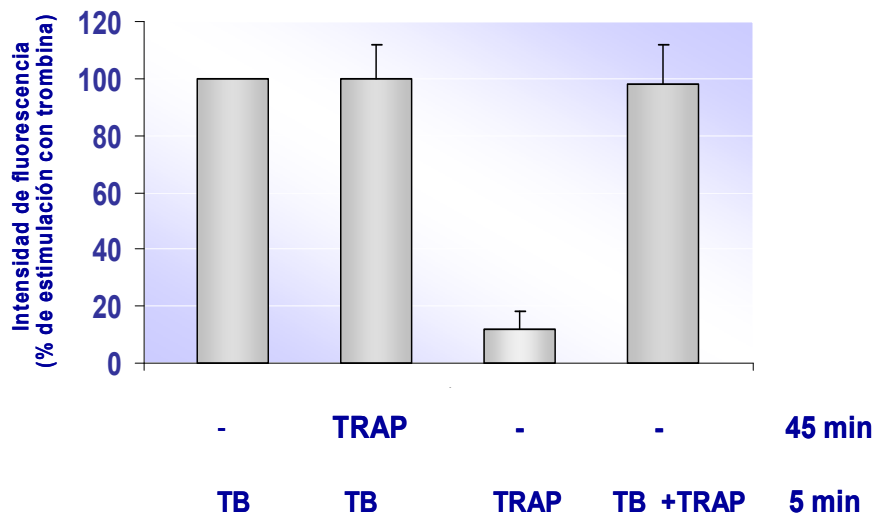
**Figura 21.** Fosforilación de p44/42 MAPK inducida por trombina no es impedida por el anticuerpo monoclonal SZ2 que reconoce GPIIb. Las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX fueron preincubadas con SZ2 (5  $\mu$ g/mL) durante 30 minutos y estimuladas con 40 mU/mL de trombina en los tiempos indicados. Lisados celulares fueron analizados mediante electroforesis en 10% SDS-PAGE según se describe en la sección de Métodos.

#### 4.1.9. Los receptores PAR endógenos no están involucrados en la respuesta de las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX a trombina.

Los datos de la Figura 22, sugieren que la fosforilación de Erk1/2 inducida por trombina estaría mediada por actividad PAR-1 endógena, dada la perceptible disminución de la respuesta a trombina, de células desensibilizadas con el hexapéptido TRAP agonista del PAR-1; sin embargo, como se sugiere en la figura 23, el grado de fijación de fibrinógeno inducida por la trombina fue idéntica en presencia o ausencia de TRAP, lo que sugiere que la actividad PAR-1 endógena, no estaría involucrada en el mecanismo de respuesta celular inducida por trombina (Figura 23).



**Figura 22.** La actividad PAR endógena no parece estar involucrada en el efecto de la trombina sobre la fijación de fibrinógeno a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX. La fosforilación inducida por trombina de p44/42MAPK fue bloqueada mediante preincubación con el hexapéptido activador TRAP-1. Las células se incubaron en presencia o ausencia de 40  $\mu$ M TRAP-1 por 45 minutos, a temperatura ambiente seguida de estimulación con 40 mU/mL de trombina durante 5 minutos. Los lisados celulares fueron analizados por electroforesis en 10% SDS-PAGE.



**Figura 23. Efecto de la trombina sobre la fijación de fibrina a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-IbIX en presencia de TRAP.** Las células se preincubaron con TRAP, seguido de estimulación con trombina  $\pm$ TRAP por 5 minutos, a continuación se añadió fibrinógeno-FITC (160  $\mu$ g/mL) y la incubación continuó durante 30 minutos más. La fijación de fibrinógeno-FITC se determinó mediante citometría de flujo. Los valores representados reflejan el producto del porcentaje de células detectadas por los valores del canal medio de intensidad de fluorescencia y fueron expresados como porcentaje del efecto de trombina. La fijación inespecífica de fibrinógeno fue sustraída de los valores hallados en presencia de trombina. Los resultados son medias de tres experimentos  $\pm$  SD.



## **4.2. PAPEL DEL COMPLEJO GPIb-IX EN LA REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA.**

La función de los receptores plaquetarios,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIb-IX-V, está fuertemente vinculada, de hecho, la activación por trombina del complejo GPIb-IX-V, como hemos visto anteriormente, es capaz de activar al receptor de fibrinógeno,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Como mencionamos en la introducción, ambos receptores son marcadores del linaje megacariocítico y se expresan en la superficie de las plaquetas. El defecto de uno de los dos receptores produce trastornos hemostáticos que pueden ser graves. Según estos antecedentes, la aparición simultánea de ambos receptores debe ser signo inequívoco de diferenciación megacariocítica.

En la segunda parte de nuestro estudio, con el ánimo de aclarar los mecanismos que regulan los procesos de maduración y diferenciación terminal megacariocítica, por tanto, la aparición de las proteínas del complejo GPIbIX, hemos seguido básicamente dos diferentes planteamientos en los que utilizamos las líneas megacariocíticas humanas pluripotentes mieloides, células K562 y Meg-01, para el abordaje de los mismos.

1. Diferenciación terminal megacariocítica estimulada mediante el tratamiento con diferentes reactivos inductores de la diferenciación: en este abordaje hemos valorado signos que están fenotípicamente asociados a la maduración y liberación de las plaquetas, tales como:

- Expresión en superficie de los principales marcadores de diferenciación megacariocítica: las subunidades de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y las subunidades GPIb $\alpha$  y GPIb $\beta$ -IX del receptor del FvW, complejo GPIb-IX.
- Aumento de tamaño, Ploidía, disminución de la proliferación y cambios morfológicos.
- Activación de las rutas de las MAPKs y PI3-K. Para este punto, como ensayo funcional hemos analizado la liberación de partículas, que esta correlacionado con el proceso fisiológico de formación plaquetaria a partir del megacariocito maduro.

2. Maduración terminal megacariocítica mediante la generación de transfectantes estables, que sobreexpresan las proteínas que conforman el complejo GPIb-IX.

### **1. Diferenciación megacariocítica mediante tratamiento con inductores.**

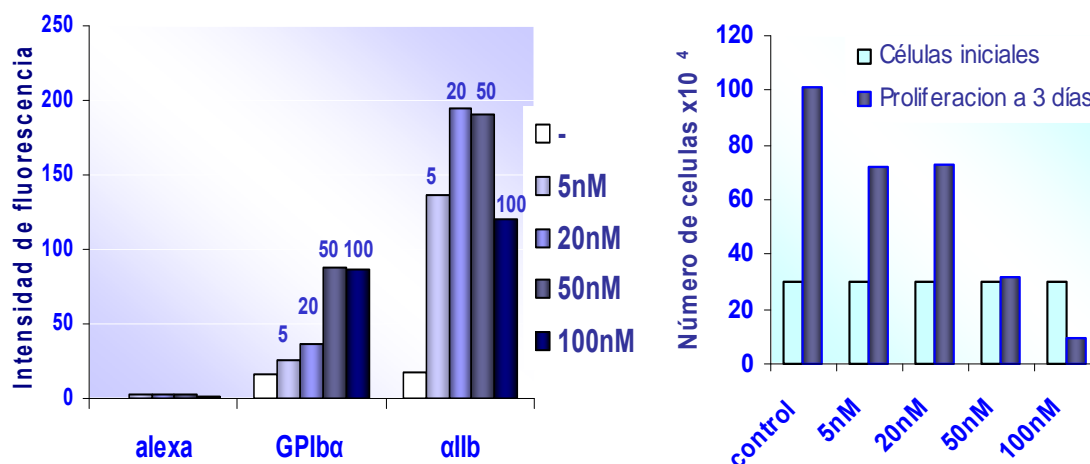
#### **1.1. Diferenciación en células K562.**

### 1.1.1. Expresión de Marcadores de diferenciación, en tratamientos con Estaurosporina (STA), SB 202190 ó PMA.

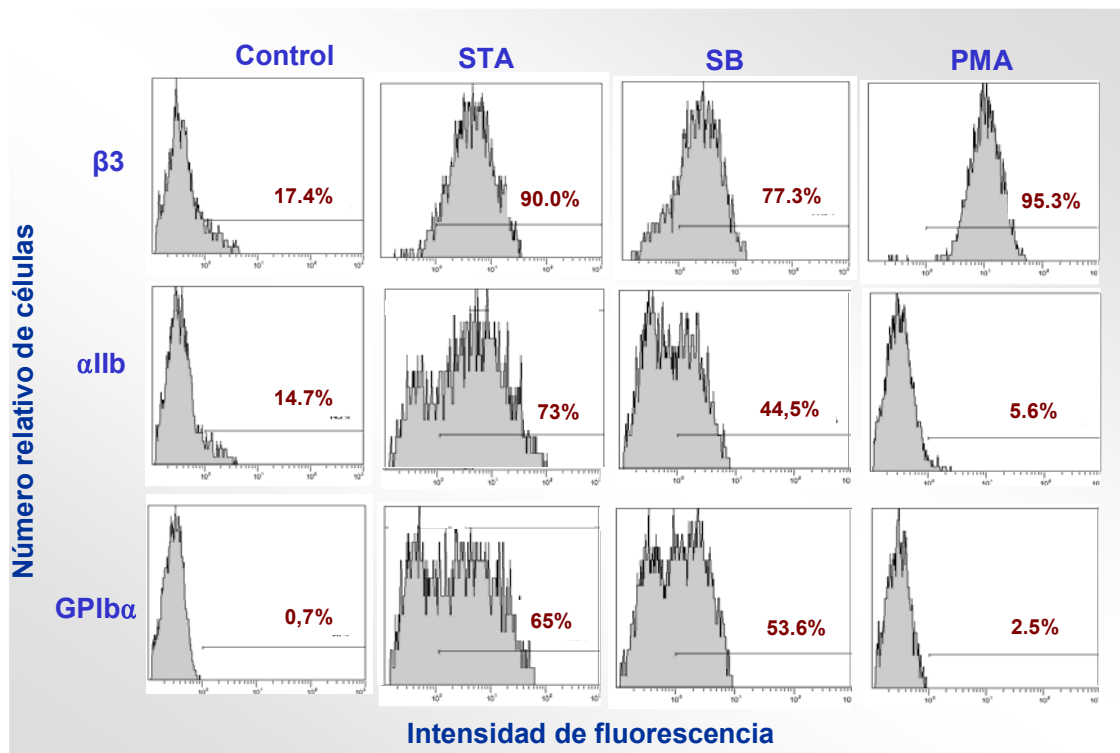
Como hemos mencionado en la introducción, se ha sugerido que la proteína quinasa C y la funcionalidad de las MAPKs podría estar involucrada con la diferenciación megacariocítica (Shelly *et al.*, 1998; Dorsey *et al.*, 2002; Jacquelin *et al.*, 2006) y teniendo en cuenta que varios trabajos demuestran como los tratamientos con estaurosporina (STA) (Lerga *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000), PMA (Whalen *et al.*, 1997; Dorsey *et al.*, 2002) y SB 202190 (Jacquelin *et al.*, 2006) inducen en las células leucémicas diferentes signos de diferenciación megacariocítica, estudiamos el efecto de estos inductores sobre la diferenciación megacariocítica de células K562, específicamente en la expresión de los marcadores del complejo GPIbIX y su implicación en éste proceso.

En primer lugar determinamos las concentraciones de PMA, estaurosporina (STA) y SB 202190 (SB) capaces de inducir en nuestras condiciones experimentales el mayor grado de diferenciación celular, teniendo en cuenta la expresión en superficie de marcadores megacariocíticos y su asociación al menor porcentaje de muerte celular. Mediante ensayos dosis-respuesta, establecimos como óptimas para este estudio concentraciones de STA 20 nM, PMA 2 nM y SB 5-10  $\mu$ M.

Resaltando el efecto de estaurosporina (STA), observamos que la expresión de los marcadores fue dosis dependiente, mientras que la tasa de proliferación celular muestra una dependencia inversa en relación a la dosis, de tal forma que la actividad proliferativa se ve comprometida incluso con las dosis bajas de estaurosporina (5nM). Con dosis superiores a 50 nM no se apreció un incremento superior de la expresión de marcadores, pero se ve aumentada la muerte celular (Figura 24).



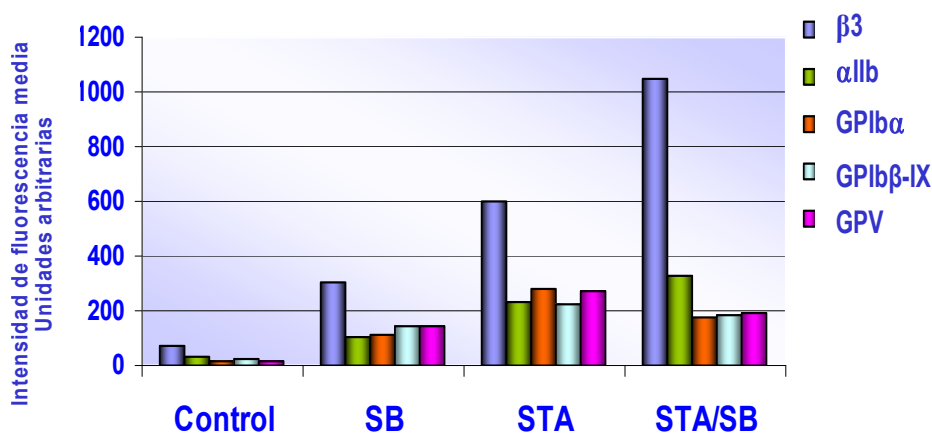
**Figura 24. Dosis respuesta del tratamiento con estaurosporina.** A) Dosis de estaurosporina (STA) y expresión de marcadores. Evaluación del incremento de la expresión de marcadores megacariocíticos a los tres días de tratamiento con dosis variable de STA. B) Dosis respuesta: efecto de dosis crecientes de estaurosporina sobre la proliferación celular, en  $3 \times 10^5$  células iniciales. Tras tres días de incubación las dosis  $\geq 50$  nM aumentan la muerte celular y no se distingue un incremento en la expresión de marcadores. Resultados de experimento representativo.



**Figura 25. Expresión en superficie de las proteínas  $\alpha IIb\beta 3$  y de la proteína GPIb $\alpha$  en células K562 tratadas con los inductores de diferenciación.** Análisis representativo que se valoró mediante citometría de flujo a los tres días de tratamiento con los diferentes inductores: 20 nM estaurosporina STA (20nM), 10 $\mu$ M SB 202190(SB) y 2nM de ester de forbol (PMA). Para el marcaje se utilizan los anticuerpos anti  $\beta 3$  (H1AG11), anti  $\alpha IIb$  (2BC1) y anti GPIb $\alpha$  (AK2).

En ausencia de tratamiento, un pequeño porcentaje de la población celular muestra cantidades detectables de las dos subunidades de la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ , marcadores tempranos de la diferenciación megacariocítica. Aunque, los tres inductores incrementan la aparición de  $\beta 3$ , el mayor efecto se observa con PMA, que induce alto grado de expresión en prácticamente el total de la población. También STA incrementa la expresión de  $\beta 3$  en el total de las células, aunque el canal medio de intensidad y por tanto, el número de moléculas por célula, es menor que con PMA. Como se muestra en este experimento representativo (figura 25), el SB 202190 no induce la expresión de  $\beta 3$  en el total de la población y, en general, el canal medio de intensidad de las células marcadas es menor. Por otra parte, a diferencia de la  $\beta 3$ , la expresión de  $\alpha IIb$  y GPIb $\alpha$  no es detectable en células K562 tratadas con PMA. Sin embargo, STA y SB inducen la expresión de ambos marcadores en un porcentaje variable de la población; en general, superior en las células tratadas con STA. Como vemos en la figura 26 A, la acción conjunta de estaurosporina (STA) y SB 202190, produjo efectos aditivos de la expresión de  $\beta 3$  y conjuntamente un aumento en la expresión de GPIb $\alpha$ . La estimulación de la expresión de  $\alpha IIb$  y GPIb $\alpha$  en estas células, se demostró también mediante análisis de inmunoprecipitación y/o western (figura 26 B).

A



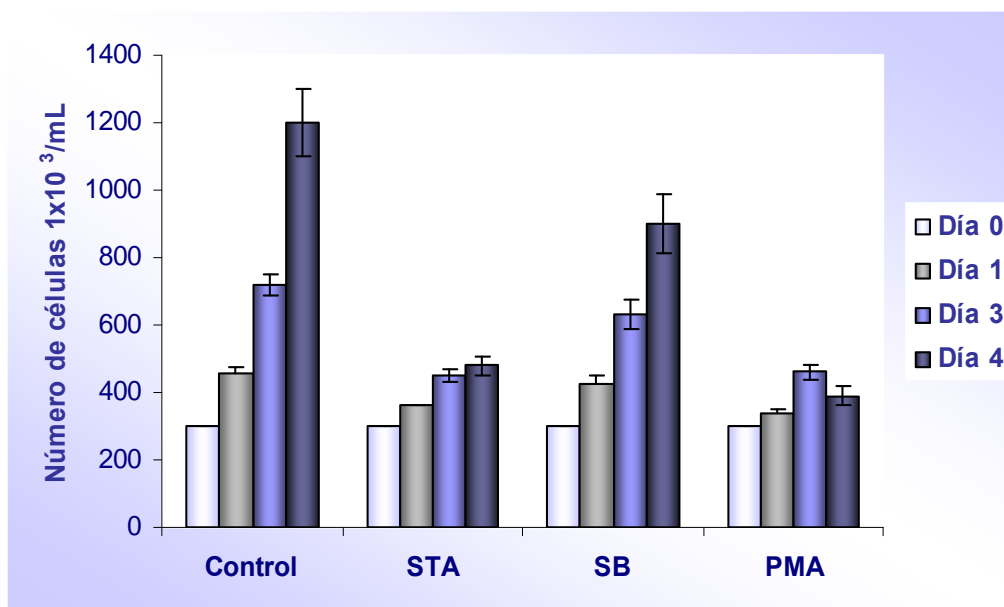
B



**Figura 26 Detección de las proteínas del complejo GPIbIX y αIIbβ3 en células K562 tratadas con los inductores de diferenciación: Estaurosporina (STA) (20nM) y/o SB202190 (10μM).** **A)** Valoración por citometría de flujo de la expresión superficial de las proteínas que conforman el complejo GPIbIX y αIIbβ3, a los tres días de tratamiento son STA y/o SB, ambos inductores aumentaron la expresión en superficie de todas las proteínas que conforman el complejo GPIbIX-V, la valoración la hicimos usando los anticuerpos: anti-β3 (H1AG11), anti-αIIb (2BC1), anti-GPIbα (AK2), anti-GPIb-IX (SZ1) y anti-GPV (CD42d). Destacamos el aumento aditivo de la expresión en superficie de la subunidad β3 de la integrina αIIbβ3, cuando las células se incuban en presencia de SB y STA (Resultados de experimento representativo). **B)** Inmunoprecipitación de GPIbα y western blot de GPIIb en lisados celulares de células K562 tratadas con los diferentes inductores. Se utilizaron los anticuerpos anti-GPIbα (SZ2) y anti αIIb (2BC1). Resultados de experimento representativo.

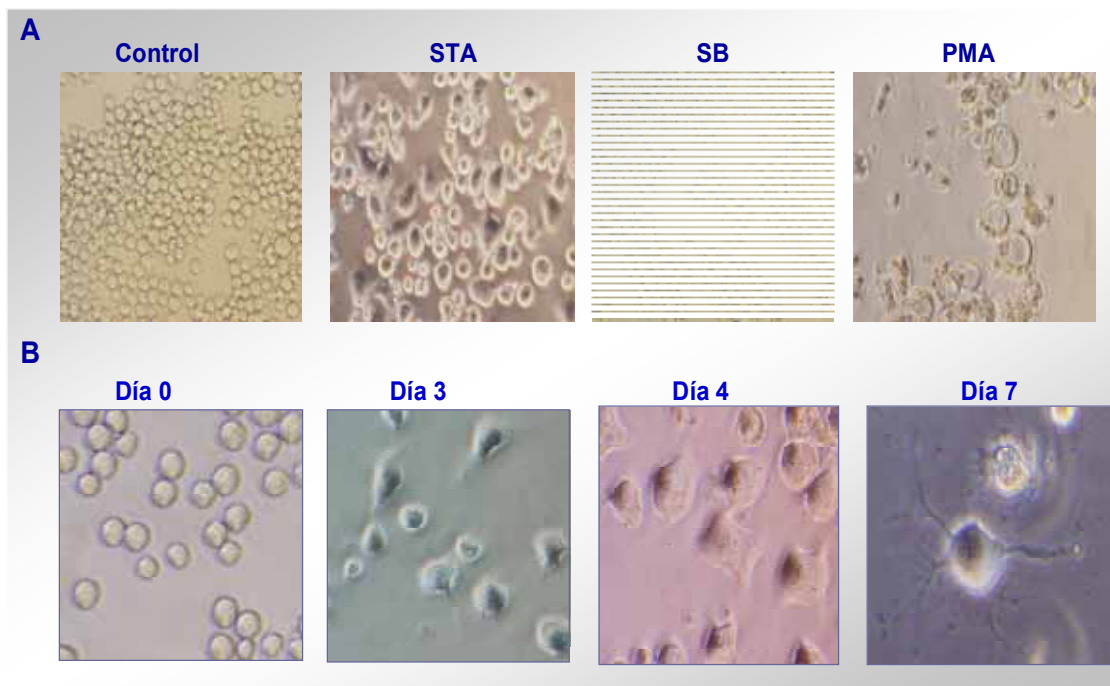
### 1.1.2. Valoración de la tasa de proliferación, fenotipo y ciclo celular.

Los tratamientos con estaurosporina y PMA disminuyen de forma notable la tasa de proliferación de las células K562 (Figura 27), efecto que es apreciable incluso tras 24 horas de tratamiento; en contraste el tratamiento con SB 202190 apenas tiene efecto.



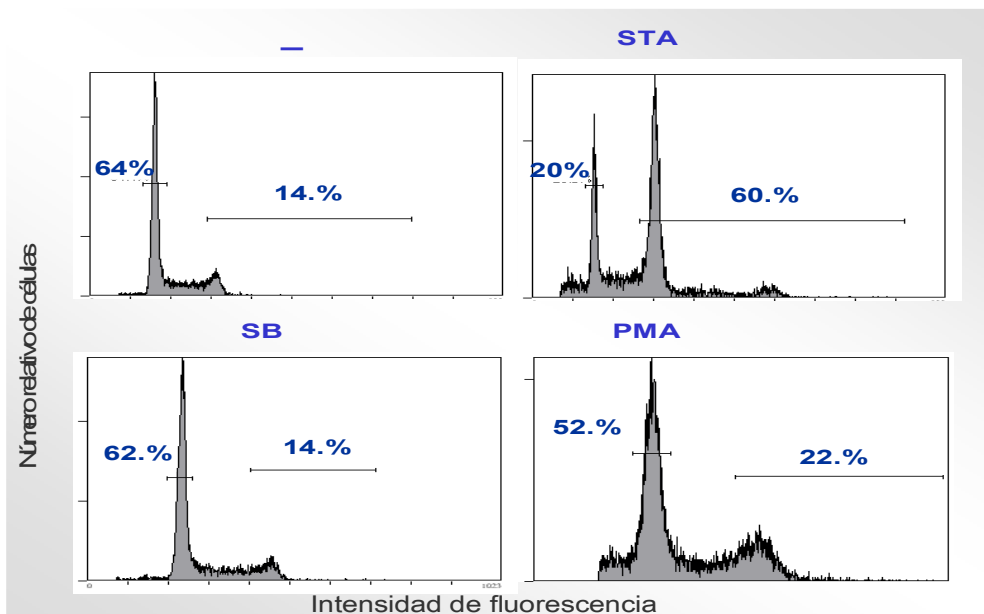
**Figura 27. Proliferación de las células K562 tratadas con inductores.** Tratamos independientemente células K562 con 20 nM de estaurosporina (STA), 10  $\mu$ M SB 202190 (SB) y 2 nM PMA. La incubación con PMA disminuyó considerablemente la proliferación, incluso a las 24 los tratamientos con STA y PMA, se ve disminuida la proliferación, los resultados mostrados son medias  $\pm$ SD de tres experimentos.

En la figura 28A se muestran los cambios morfológicos de las células K562 asociadas al tratamiento con los inductores de diferenciación. Las células no tratadas constituyen una población homogénea con forma redondeada. Después de tres días de tratamiento, las células incubadas con PMA presentan en su mayoría una morfología próxima a la del monocito-macrófago, con un aumento de la relación citoplasma/núcleo, desplazamiento del núcleo por grandes vacuolas que influyen en el aumento del tamaño, y superficie irregular debido a la proyección de lamelipodios. Estos cambios morfológicos difieren totalmente de los que se observan en las células incubadas con STA, con el que se promueve en la mayor parte de las células, una morfología típicamente megacariocítica con aumento considerable del tamaño, presencia de núcleos lobulados y un elevado porcentaje de células con presencia de prolongaciones de tipo filopodio. Con ambos tratamientos las células tienen tendencia a agruparse y adherirse a la superficie del plato. En contraste, las células estimuladas con SB no presentan cambios morfológicos aparentes. Los cambios morfológicos adoptados por las células tratadas con estaurosporina se hacen notorios incluso a las 24 horas de tratamiento y se acentúan en tratamientos largos de más de 4 días, cuando se aprecia un fenotipo más similar al de los megacariocíticos en sus estadios finales de diferenciación. (Figura 28B)



**Figura 28. Morfología de las células tratadas con inductores** **A)** Cambios morfológicos de las células K562 tratadas con 10 $\mu$ M de SB 202190, 20nM de STA y 2nM de PMA. Las fotografías mostradas fueron tomadas tras 72 horas de tratamiento con cada inductor. Objetivo 20X. **B).** Cronología de los cambios morfológicos durante la inducción megacariocítica estimulada por estaurosporina (STA) en células K562. Fotografías de los cambios morfológicos de las células K562 tratadas con STA (20nM). Los cambios fueron más notorios a los 7 días de tratamiento cuando se aprecia aumento de tamaño y aparición de prolongaciones pseudopódicas con características parecidas a proplaquetas. Objetivo 40X.

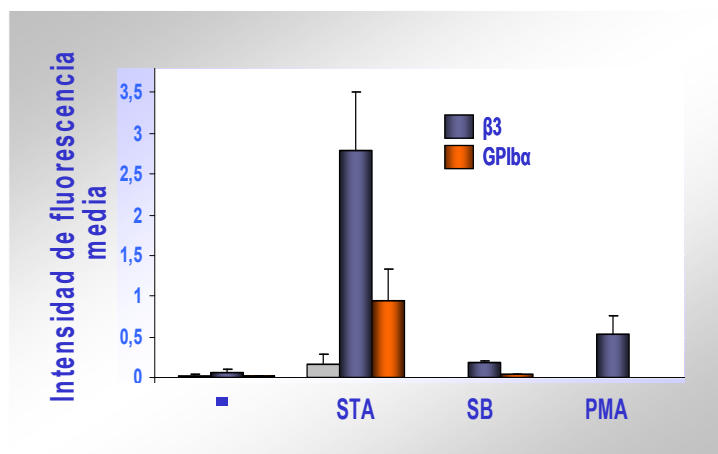
Con el fin de explorar si el aumento de tamaño y la aparición de núcleos lobulados, estaba relacionado con el aumento de endo-reduplicación, característica propia de los megacariocitos, analizamos el grado de la ploidía de las células tratadas. El análisis del DNA muestra como en los tratamientos con STA mas del 50% de las células diferenciadas se hallan en fase G2, distinguiéndose además una progresión en el ciclo, esto corresponde a un contenido de DNA de 4C o superior, sin embargo en los tratamientos con SB202190 (10  $\mu$ M) y PMA (2-10nM) al igual que las células no tratadas, mas del 50% de las células se encuentran en fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (contenido de DNA 2C) y un porcentaje menor de células se encuentran en la fase G2 (contenido de DNA de 4C o superior). Por tanto en los tratamientos con STA pero no con PMA ó SB 202190, induce en las células K562, un aumento de la ploidía. El mayor porcentaje de células en fase S del ciclo se observa en las células control y en las células tratadas con SB 202190, con respecto a las células tratadas con PMA, las células reflejan una menor tasa de proliferación, con un porcentaje de células en fase S menor (Figura 29).



**Figura 29. Análisis de la ploidía mediante valoración del ciclo celular por citometría de flujo.** Mostramos el patrón de DNA correspondiente al ciclo celular (para  $1.5 \times 10^5$  células) con o sin la inducción de la diferenciación, la valoración se realizó mediante citometría de flujo usando el método de tinción con yoduro de propidio, después de tres días de tratamiento con los agentes indicados. La progresión en el ciclo de las células tratadas con estaurosporina (STA) es notoria, con SB202190 no hay cambios distinguibles respecto a las células sin tratamiento y con PMA, se observa un pequeño aumento de células estancadas en G2. Resultado de experimento representativo.

### 1.1.3 Análisis de las partículas liberadas al medio tras tratamientos con estaurosporina (STA), SB 202190, o PMA.

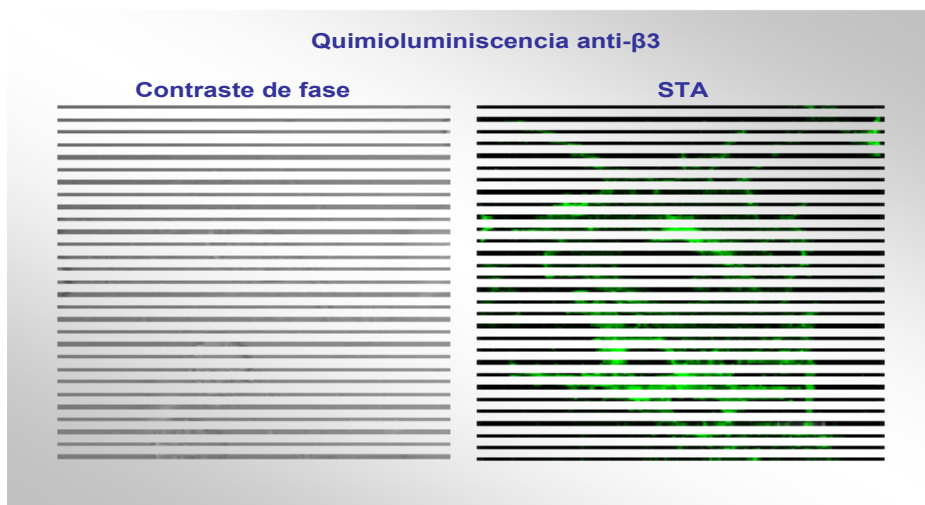
En los procesos de diferenciación y maduración del megacariocito, el objetivo final es la formación de proplaquetas y la liberación de plaquetas a la sangre. En nuestros ensayos consideramos de interés analizar si este proceso fisiológico, que correspondería *in vitro* a la liberación de partículas al medio, pudiera corresponder a la liberación de plaquetas tras el tratamiento con inductores de diferenciación megacariocítica. En nuestros ensayos realizamos tratamientos largos de diferenciación, de al menos 5 días, con inductores de diferenciación megacariocítica y analizamos por citometría de flujo, la expresión de las proteínas GPIb $\alpha$  y  $\beta$ 3 en partículas de tamaño comprendido entre 2-5  $\mu$ m que no fijan anexina V y por tanto, no corresponden a fragmentos desprendidos de células apoptóticas. Para el análisis se utilizaron partículas poliméricas sintéticas de 2 y 5 micras, como patrones para calibrar el tamaño de distribución en el citómetro, seleccionamos las partículas con estos radios que corresponderían al tamaño de las plaquetas. En la Figura 30, representamos el análisis de las partículas negativas para anexina V con tamaños de 2-5  $\mu$ m, que son además positivas para los marcadores de diferenciación  $\beta$ 3 y GPIb $\alpha$ , siendo la expresión de marcadores en partículas significativamente superior en los tratamientos con estaurosporina que con los obtenidos en los otros tratamientos.



**Figura 30** Análisis de las partículas negativas para anexina V y positivas para la expresión de GPIb $\alpha$  y  $\beta 3$ . Se recolectaron las células y las partículas resultantes de los tratamientos mediante centrifugación, se marcaron con los anticuerpos monoclonales específicos para GPIb $\alpha$  y  $\beta 3$ , se incorporó la anexina V y el yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo. Los datos son medias  $\pm$ SD de tres experimentos realizados

#### 1.1.4. Localización y distribución en superficie de $\alpha$ IIb $\beta 3$ en células diferenciadas con estaurosporina.

Con el fin de analizar las características morfológicas de las células K562 tratadas con estaurosporina y determinar la localización y distribución en superficie de  $\alpha$ IIb $\beta 3$ , estudiamos dichas células mediante inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti- $\beta 3$  que reconocen el heterodímero  $\alpha$ IIb $\beta 3$ . El análisis lo realizamos en células tratadas durante 7 días con estaurosporina. Las células se analizaron mediante microscopía confocal. En la figura 31 se muestra claramente la disposición de  $\alpha$ IIb $\beta 3$  a lo largo de la membrana plasmática así como a lo largo de las extensiones celulares y en pequeñas partículas que podrían ser proplaquetas presentes en su proximidad.

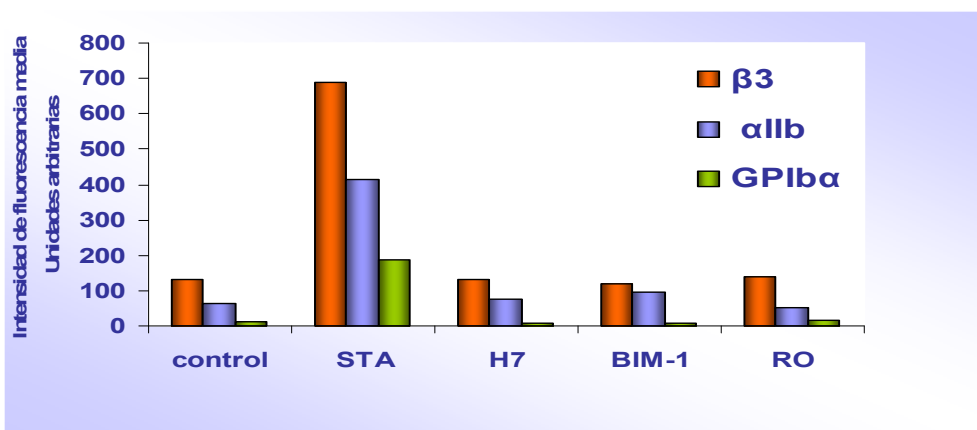


**Figura 31.** Caracterización morfológica y localización de  $\beta 3$  por microscopía confocal en células K562. Las células se trataron durante 7 días con estaurosporina, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti- $\beta 3$  (H1AG11) que reconoce el heterodímero  $\alpha$ IIb $\beta 3$ . Se observa la distribución homogénea de  $\alpha$ IIb $\beta 3$  sobre la superficie celular y a lo largo de las extensiones de tipo pseudópodo, donde la localización puntual de  $\beta 3$  podría destacar la formación de proplaquetas.



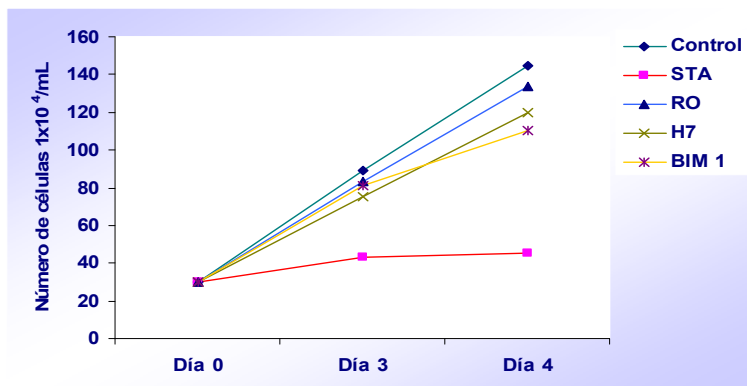
Los resultados mencionados indican que el aumento de expresión de  $\beta 3$  es un rasgo común en la diferenciación de células K562 desencadenada por STA, PMA y SB202190, sin embargo el fenotipo que más se aproxima al del megacariocito es el inducido por STA.

Dado que STA es un potente inhibidor de la proteína kinasa C (PKC), analizamos el efecto de los tratamientos con diferentes dosis de otros inhibidores de PKC: H7 de 100nM -25  $\mu$ M, BIM 1 de 20nM -1 $\mu$ M, RO de 50-200 nM), los dos últimos altamente selectivos. Los resultados de la Figura 32, indican que con ninguno de estos compuestos se logra inducir la expresión de los marcadores megacariocíticos de diferenciación terminal.



**Figura 32. Otros inhibidores de PKC no favorecen la expresión de marcadores de diferenciación megacariocítica.** Las células K562 se incuban 3 días en presencia de los diferentes inhibidores. Estaurosporina (STA) 50 nM; H7 100 nM; BIM-1 100 nM; RO 318220 (RO) 100 nM. Evaluación por citometría de flujo de la expresión en superficie de marcadores de diferenciación megacariocíticos:  $\beta 3$  (H1AG11),  $\alpha IIb$  (2BC1) y GPIb $\alpha$  (AK2) en un experimento representativo.

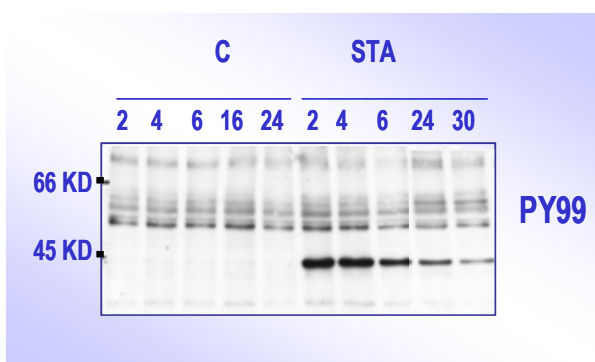
El aumento de la expresión de las proteínas que conforman el complejo GPIbIX y las proteínas que conforman el receptor de fibrinógeno  $\alpha IIb\beta 3$ , está directamente relacionados con la disminución de la actividad proliferativa de las células tratadas con estaurosporina, que fue significativamente menor o casi inexistente comparada con el efecto de los demás inhibidores (Figura 33).



**Figura 33. Valoración de la proliferación celular de las células tratadas con los diferentes inhibidores.** El número inicial de células fue  $30 \times 10^4$ /mL, a las que se les añadió cada tratamiento: estaurosporina (STA) 50 nM, H7 100 nM, BIM-1 100 nM, RO-31 82 20 (RO) 100 nM. El conteo celular se realizó a los 3 y 4 días de tratamiento.

### 1.1.5. Rutas de señalización implicadas en la diferenciación de las células K562.

Con el fin de determinar la participación de proteínas fosforiladas en los mecanismos de señalización implicados en la diferenciación megacariocítica (expresión de marcadores en superficie, ploidía, tamaño celular y fenotipo) decidimos valorar el patrón de fosfotirosinas totales en lisados de células tratadas con estaurosporina (Figura 34). Aproximadamente  $3 \times 10^5$  células se incubaron en medio D-MEM con 1% de suero fetal se dejaron estabilizar por dos horas en incubador a 37 °C. Posteriormente se añadió estaurosporina (STA) 20nM y tras 2, 4, 6, 24 y 30 horas de tratamiento, recolectamos las células, se centrifugaron y se lisaron con tampón Laemmli 2X-  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente, se resolvieron los lisados en geles SDS-PAGE al 10%, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF que se analizó mediante inmunodetección con el anticuerpo monoclonal p-Tyr (PY99) a una dilución 1:500, se usó como anticuerpo secundario anti-mouse IgG (Bio-Rad) a una dilución de 1:3000.



**Figura 34. Patrón de fosforilación en tirosina de proteínas celulares totales (células K562).** Valoración por Western blot de lisados celulares totales en buffer Laemmli 2X  $\beta$ -mercaptoetanol. La membrana con las proteínas transferidas se incubó con el anticuerpo monoclonal p-Tyr (PY99). Se observó que en los tratamientos con estaurosporina, la fosforilación de proteínas de  $\approx 45$ KD aumentó y luego disminuyó progresivamente en el tiempo. Experimento representativo.

### Rutas de MAPK

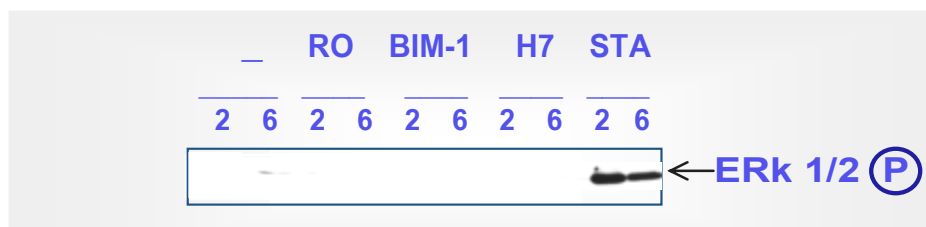
Estudios realizados por diferentes autores en otros modelos celulares indican que la diferenciación megacariocítica requiere la activación de MAPK ERK $\frac{1}{2}$  (Racke *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2007; Jacquelin *et al.*, 2006) En nuestras condiciones experimentales, la estimulación de las células K562 por PMA o STA se acompaña de un marcado incremento de la fosforilación de ERK1/2, que se mantiene hasta 24 horas. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor SB 202190 no altera la fosforilación de esta quinasa (Figura 35) lo cual podría indicar que la activación sostenida de ERK  $\frac{1}{2}$  no es requisito indispensable para el proceso de diferenciación megacariocítica. También evaluamos las vías de señalización de MAPK, JNK y p38 durante la diferenciación megacariocítica inducida por estaurosporina, SB 202190 y PMA. La activación de ERK1/2, p38 MAPK y JNK es valorada en función de su grado de fosforilación (Herrant *et al.*, 2002); sin embargo, debemos tener en cuenta que SB 202190 inhibe la actividad de p38 pero no su fosforilación. En la Figura 35, se muestran los resultados obtenidos por western blot del análisis de fosforilación de proteínas ERK1/2, p38 MAPK y JNK quinasas. Los lisados celulares se obtuvieron a los 30 minutos, 2, 6 y 24 horas tras el inicio del tratamiento con los inductores. STA, SB 202190 y PMA. STA induce fosforilación de ERK1/2 con un máximo aproximado a las 2

horas y decae progresivamente en el tiempo, la fosforilación de p38 dura pocas horas y es leve en comparación con la fosforilación de ERK, mientras que la fosforilación de JNK guarda un patrón similar al de la fosforilación de ERK1/2. Con PMA se observó un aumento en la fosforilación de ERK1/2 que se mantuvo en un tiempo, incluso en más de 72 horas (datos no mostrados), el patrón de fosforilación de JNK es similar y en contraste a la fosforilación producida por STA, la fosforilación de p38 es más sostenida. Los tratamientos con SB 202190 prácticamente no alteran la fosforilación de estas quinasas.



**Figura 35. Patrón de fosforilación de ERK1/2, p38 MAPK y JNK, inducida por tratamientos con estaurosporina (STA), SB 202190 (SB) o ésteres de forbol (PMA).** Las células K-562 fueron preincubadas 2 horas antes con medio 1% suero fetal bovino a una densidad de  $30 \times 10^4$ . Posteriormente se inicia el tratamiento con los inductores durante 30 minutos, 2, 6 y 24 horas, las lo cual las células se centrifugan a baja velocidad y se lisan. Los lisados celulares fueron analizados mediante electroforesis en geles 10% SDS-PAGE y western blot con anticuerpos específicos. Los resultados mostrados son representativos de, al menos, 3 experimentos.

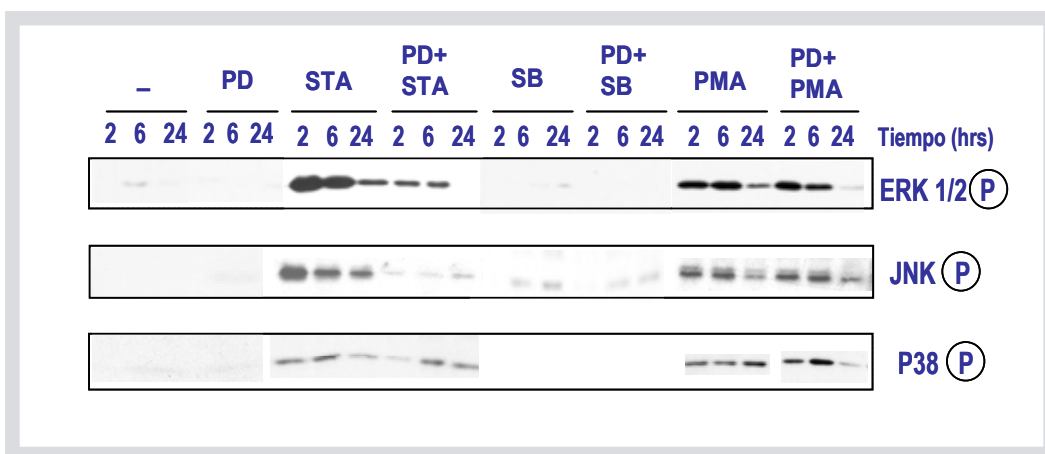
Estudiamos también el efecto de otros inhibidores de PKC como H7, BIM-1 y RO318220 en el patrón de fosforilación. Los resultados mostrados en la figura 36 nos indican que ninguno de estos inhibidores, altera el patrón de fosforilación de ERK 1/2, lo cual apoya la importancia de la activación de MAPK ERK 1/2 en la diferenciación inducida por estaurosporina.



**Figura 36. Fosforilación de ERK1/2 inducida por el tratamiento con inhibidores de PKC.** El tratamiento con inhibidores se llevó a cabo tras mantener las células K562 durante 2 horas a una densidad de  $3 \times 10^5$  /mL DMEM con 1% de suero. Los inhibidores, (RO) RO-318220 100 nM, BIM-1 100 nM, H7 100 nM y STA 20 nM se añadieron a las células y se incubaron durante 2 y 6 horas. Tras la incubación, las células se lisaron y analizaron en geles 10% SDS-PAGE en condiciones reductoras. Finalmente las proteínas fueron transferidas a membranas de nylon y se analizaron con un anticuerpo anti-ERK1/2 fosforilada. La figura muestra los resultados de un experimento representativo.

### 1.1.6. La inhibición de ERK/MAP quinasas por el inhibidor de MEK1 (PD98059) bloquea la diferenciación megacariocítica en células K562.

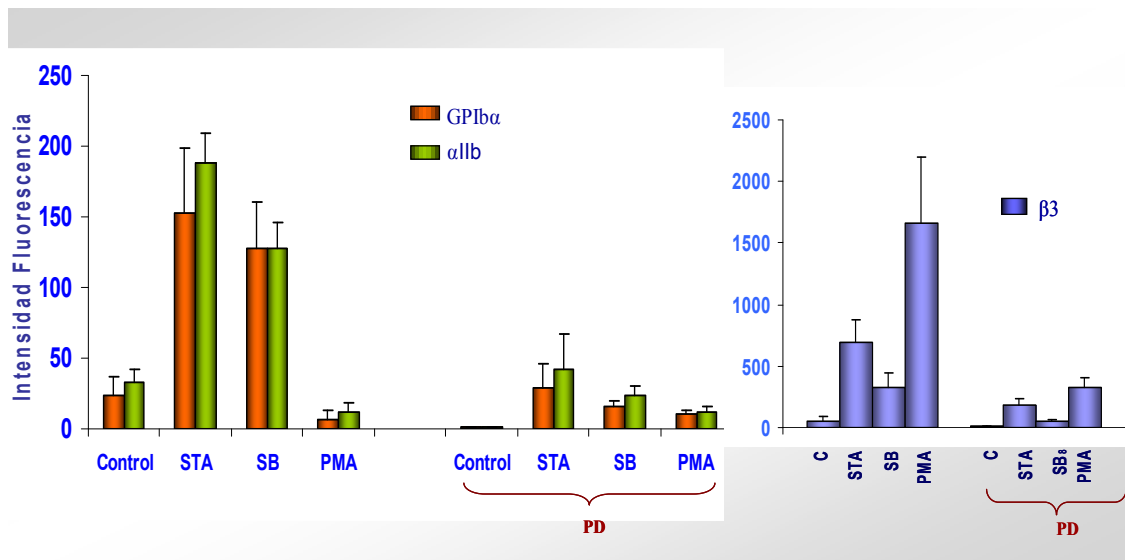
Para determinar si la diferenciación megacariocítica inducida por estaurosporina (20 nM), SB 202190 (10  $\mu$ M) y PMA (2 nM) está directamente relacionada con la activación de la ruta de señalización de ERK/MAP quinasas, usamos un inhibidor específico de esta ruta, el compuesto sintético PD98059, que inhibe la actividad de ERK1 y ERK2 con valores de IC<sub>50</sub> de 2-7  $\mu$ M y de 50  $\mu$ M, respectivamente. En experimentos previos de dosis respuesta, determinamos que 20  $\mu$ M de PD98059 era la concentración óptima que inhibía ERK1/2 sin producir apoptosis. Dosis de hasta 100  $\mu$ M de PD98059 fueron efectivas, pero en combinación con los otros reactivos aumentó la muerte celular, y dosis superiores a 100  $\mu$ M fueron claramente apoptóticas. Como se observa en la figura 37, en nuestras condiciones experimentales, la preincubación de las células con PD98059 bloquea de forma importante la fosforilación de ERK1/2 inducida por el tratamiento con estaurosporina (STA). Un efecto similar se observó con U-0126, inhibidor de MEK1/2 (no mostrado). Sin embargo, la fosforilación de ERK en las primeras horas tras la estimulación con PMA experimenta sólo una discreta reducción en las células tratadas con PD 98059. En las células estimuladas por STA, la fosforilación de JNK (c-Jun N-terminal kinase), componente de otra de las cascadas de señalización de las quinasas MAP, corre paralela a la de ERK1/2. Como resultado inesperado, observamos que la activación de JNK es bloqueada en gran medida en presencia de PD98059.



**Figura 37. Efecto del pretratamiento con PD98059 sobre la fosforilación de ERK1/2, p38 MAPK y JNK, inducido con estaurosporina (STA) o por ésteres de forbol (PMA).** Células K562 ( $3 \times 10^5$ ) se depositaron en pocillos individuales en medio D-MEM con 1% suero. Posteriormente se les añadió +/- PD98059 dos horas antes de añadir los inductores de diferenciación STA, SB y PMA a las concentraciones ya mencionadas; tras 2, 6 y 24 horas se lisaron las células en tampón Laemmli 2 x  $\beta$ -mercaptoetanol y las proteínas se resolvieron en 10% SDS-PAGE y se analizaron mediante western blot con los anticuerpos específicos para las formas de ERK1/2, p38 MAPK y JNK fosforiladas. Los resultados mostrados son representativos de, al menos, 3 experimentos.

Con el fin de determinar el papel de la activación sostenida de ERK1/2 en la diferenciación de las células K562, analizamos la expresión de marcadores de superficie en células preincubadas en ausencia o presencia del inhibidor PD98059. Los resultados en la figura 38 muestran que la

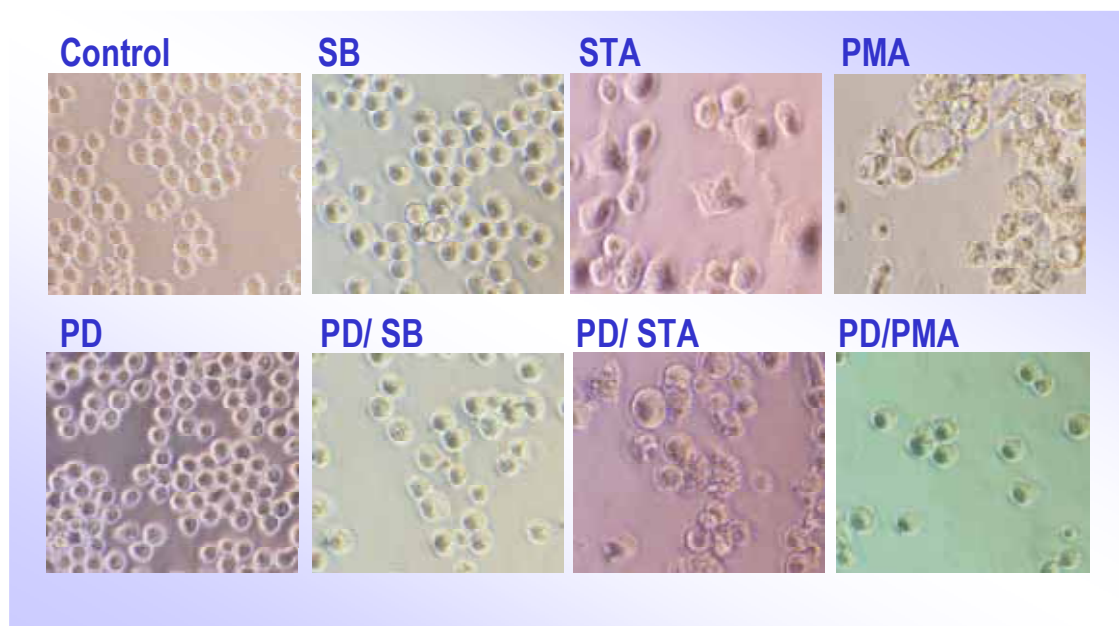
presencia del inhibidor impide la expresión de  $\beta 3$ ,  $\alpha IIb$  y  $GPIb\alpha$  inducida por PMA, STA y SB20219. Hay que hacer notar que la inhibición de ERK1/2 con PD 98059 permitió recuperar parcialmente el arresto de la proliferación. En concordancia con los resultados en la expresión de marcadores de superficie, el inhibidor PD98059 revierte en gran medida los rasgos morfológicos que adquieren las células incubadas con PMA o STA.



**Figura 38. Efecto del inhibidor de MEK1 PD98059 sobre la expresión de marcadores de diferenciación inducidos por estaurosporina (STA), SB202190 (SB) o ésteres de forbol (PMA).** Antes del tratamiento las células K562 se incubaron a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  durante 2 horas en 200  $\mu$ l de medio D-MEM 1% suero. Posteriormente se incubaron con 20  $\mu$ M de PD98059 durante 2 horas seguido de la adición de cada uno de los inductores, a las concentraciones ya indicadas. Tras tres días de tratamiento, evaluamos mediante citometría de flujo la expresión en superficie de  $GPIb\alpha$ ,  $\alpha IIb$  y  $\beta 3$ . Los valores son medias  $\pm$  DS de tres experimentos.

La figura 39 muestra que, en presencia de PD98059, el fenotipo característico de las células incubadas con PMA está atenuado y no se observa en toda la población. Las células tratadas con STA en presencia del inhibidor conservan un mayor tamaño pero su capacidad de adherirse y extender prolongaciones tipo filopodio está marcadamente reducida.

Como ya mencionamos anteriormente, SB no aumenta de forma apreciable la fosforilación de esta MAPK. Por tanto, la observación de que PD98059 bloquee tanto la expresión de marcadores producida por SB como la expresión basal en células no tratadas, sugiere que un estado de fosforilación basal de ERK1/2 es esencial para que la célula inicie un programa de diferenciación.

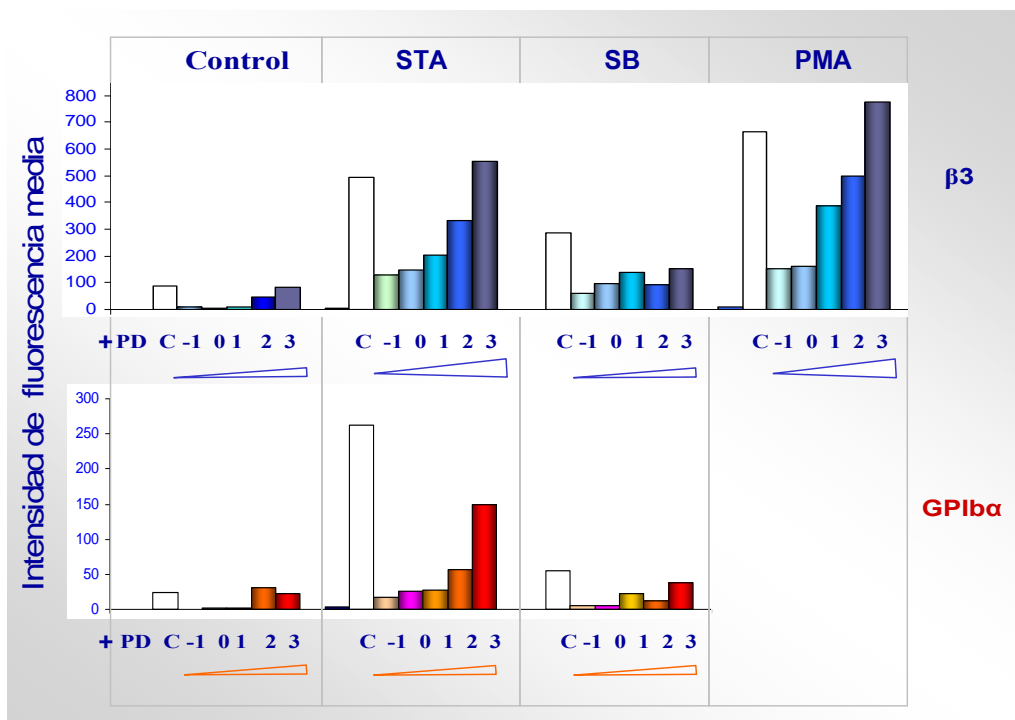


**Figura 39. Imágenes de la reversión producida por PD 98059 (20  $\mu$ M) de los cambios morfológicos inducidos por estaurosporina (STA), SB 202190 (SB) o por ésteres de forbol (PMA).** Las imágenes se tomaron tres días después de inducir la diferenciación con las concentraciones arriba mencionadas de STA, SB o PMA. La inhibición con PD98059 revierte el efecto de STA, las células no se adhieren ni extienden, pero siguen teniendo un tamaño mayor que las células sin tratar. PD 98059 también rescató el fenotipo característico inducido por PMA, pero la proliferación no se recuperó completamente.

#### 1.1.7. Activación sostenida de ERK y diferenciación megacariocítica.

Para evaluar si PD 98059 podía revertir el efecto de inductores de diferenciación de forma sostenida en el tiempo, una vez inducida la diferenciación con estaurosporina (STA), SB 202190 o PMA, analizamos, por citometría de flujo la expresión de los marcadores de diferenciación, GPIb $\alpha$  y  $\beta$ 3, a las 96 horas de inducida la diferenciación. Los resultados sugieren que la expresión en superficie de dichos marcadores requiere una activación sostenida de ERK1/2. En la figura 40 mostramos que, una vez se ha iniciado el proceso de diferenciación, PD 98059 disminuyó a lo largo del tiempo, su capacidad de revertir la expresión en superficie de los marcadores de diferenciación.

En los ensayos, PD98059 se añadió al cultivo celular 24 horas antes, al mismo tiempo, ó 24, 48 ó 72 horas después de iniciarse el tratamiento con los inductores de diferenciación, y se determinó la expresión de los marcadores tras 4 días de iniciado el tratamiento. Se puede apreciar que el bloqueo de los efectos de PMA y STA en la expresión de  $\beta$ 3 depende del momento en que se añade el inhibidor, y que no se observa inhibición cuando el PD98059 se añade a las 72 horas de iniciarse el tratamiento. El marcador de diferenciación terminal GPIb $\alpha$  muestra, sin embargo, una dependencia de la actividad de ERK más prolongada en el tiempo. Por otra parte, el bloqueo del efecto de SB 202190 incluso cuando el inhibidor se añade al final del tratamiento indica que unos niveles mínimos de activación de ERK1/2 son necesarios durante todo el proceso de diferenciación inducido por SB 202190.



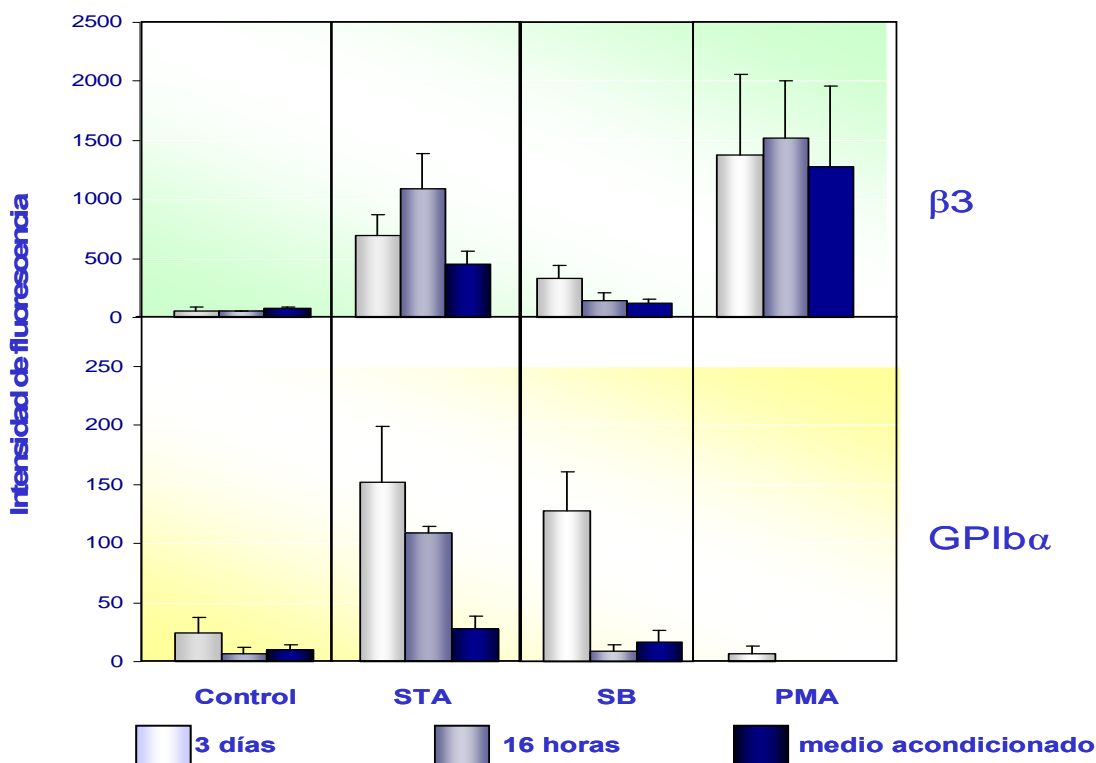
**Figura 40. Evaluación temporal del efecto de PD98059 sobre la diferenciación de células K562 inducida por estaurosporina (STA), SB202190 (SB) o PMA.** PD98059 se añadió a las células K562 a diferentes tiempos desde el día anterior al inicio del tratamiento con cada inductor, (día -1), hasta 3 días después de inducida la diferenciación. Tras 96 horas de tratamiento con los inductores STA, SB y PMA a las concentraciones descritas, las muestras se analizaron por citometría de flujo para determina la expresión en superficie de los marcadores de diferenciación utilizando anticuerpos monoclonales específicos. La figura muestra los resultados de un experimento representativo.

#### 1.1.8. Inducción de la diferenciación megacariocítica con medios de cultivo “acondicionados” por tratamientos con estaurosporina, SB 202190 o PMA.

Dado que la activación sostenida de la MAPK ERK1/2 parece determinante en la diferenciación de las células K562 estimuladas con STA o PMA, consideramos de interés explorar la posibilidad de que esta ruta de señalización se mantenga activada a través de la secreción de mediadores extracelulares. Con este fin se realizó una serie de experimentos en que las células son incubadas con PMA, STA ó SB durante solo 16 horas. Seguidamente, se retiran los agentes inductores mediante centrifugación y se continúa la incubación con medio fresco durante 3 días. A continuación, este medio, que denominaremos “acondicionado” se separa por centrifugación y se emplea para incubar nuevas células. En paralelo y como referencia, otras células se sometieron a tratamientos de 3 días sin retirar los inductores de diferenciación. En todos los casos se determina la expresión de marcadores de superficie después de 3 días de incubación. Los resultados recopilados en la Figura 41, indican que 16 horas de tratamiento con STA ó PMA son suficientes para que las células k562 expresen  $\beta 3$ , incluso en cuantía superior a la de células incubadas durante 3 días en presencia de los inductores. La expresión de GPIb $\alpha$ , aunque no alcanza los valores de las células incubadas 3 días en presencia de STA, se induce también de forma notable. Sin embargo, los tratamientos



con medio “acondicionado” no son suficientes para que la ploidía aumente, ni para que las células adquieran el fenotipo característico de los megacariocitos maduros, con extensiones ó prolongaciones de tipo filopodio. (Datos no mostrados). En contraste, la incubación de 16 horas con SB parece insuficiente; la expresión de  $\beta 3$  está significativamente reducida y no se detecta incremento de GPIb $\alpha$ . Como se aprecia en la figura 41, el medio “acondicionado” por células tratadas durante 16 horas con PMA es capaz de inducir niveles de expresión de  $\beta 3$  similares a los de células tratadas directamente con PMA. Aunque en menor grado, el medio “acondicionado” por células tratadas con STA, pero no con SB, tiene también capacidad para estimular la expresión de  $\beta 3$  y GPIb $\alpha$ . Estos resultados sugieren que en los tratamientos con SB 202190, para inducir aumento en la expresión de marcadores, se requiere una inhibición más prolongada. La inducción de la diferenciación con medios “acondicionados” se revirtió parcialmente cuando suplementamos el medio acondicionado con el inhibidor de ERK PD98059 (resultados no mostrados). Los datos podrían sugerir la posibilidad de que un mecanismo autocrino de señalización induciría la diferenciación y que requeriría niveles basales bajos de activación de ERK1/2, la cual aumenta tras tratamientos con estaurosporina, en tiempos cortos como se mostró en la Figura 35.

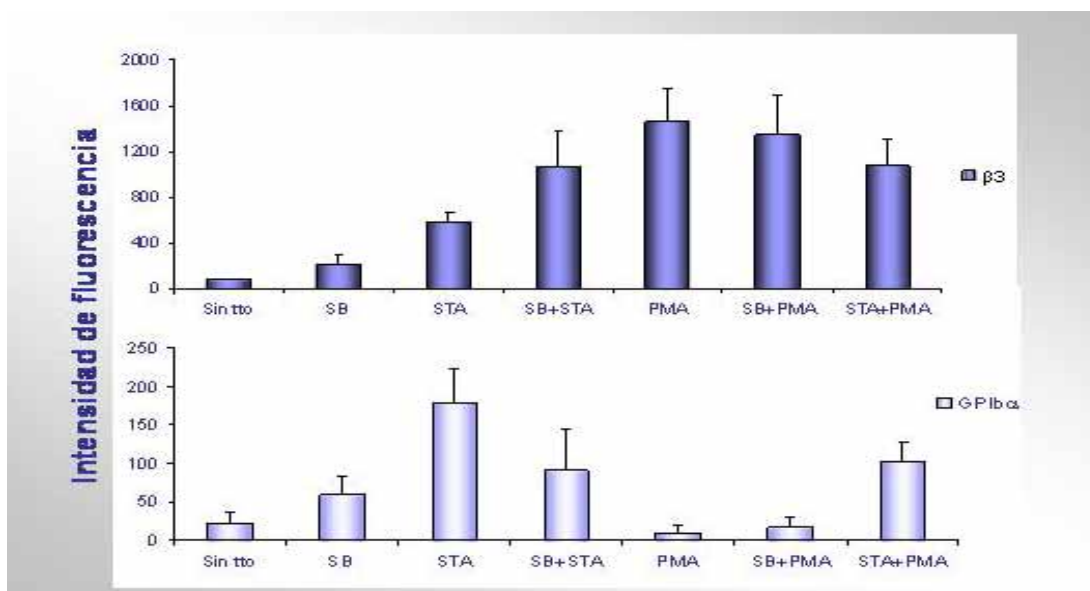


**Figura 41. Inducción de diferenciación megacariocítica de células K562 tratadas con medio “acondicionado”.** Las células K562 se incubaron con 20 nM estaurosporina (STA), 10  $\mu$ M SB 202190 (SB) o 2 nM PMA en medio DMEM con suero al 1%. A las 16 horas se recogieron las células, se lavaron y se incubaron con medio fresco durante 3 días, posteriormente se recogió el medio “acondicionado” en el que se incubaron durante 3 días las células frescas. A los tres días de incubación se analizó por citometría de flujo la expresión en superficie de GPIb $\alpha$  y  $\beta 3$  de las células K562 tratadas.



### 1.1.9. Efecto combinado de los inhibidores de diferenciación.

Consideramos de interés analizar también el efecto de la adición de diferentes combinaciones de los inductores SB 202190, estaurosporina (STA) y PMA. Como se ha mostrado previamente, PMA produce el mayor aumento de la expresión de  $\beta 3$ , pero no tiene efecto en la expresión del marcador tardío GPIb $\alpha$ . STA y SB 202190 incrementan la expresión de ambos marcadores. Sin embargo, el grado de expresión inducido por SB 202190 es menor y, a diferencia del efecto de STA, no se acompaña de aumento de ploidía. La adición simultánea de estaurosporina y SB 202190 como se comentó anteriormente, potencia la expresión de  $\beta 3$  (Figura 42). Sin embargo, la expresión de  $\beta 3$  inducida por PMA no se incrementa de forma significativa con la adición simultánea de STA o SB 202190; por el contrario, en la mayor parte de los experimentos, STA bloquea parcialmente el efecto de PMA. A diferencia de lo que ocurre con la expresión de  $\beta 3$ , la combinación de STA y SB 202190 disminuye la expresión de GPIb $\alpha$  inducida por STA, así como la ploidía (datos no mostrados). Por otra parte, la presencia de PMA inhibe de forma significativa la expresión estimulada por STA o por SB 202190 (Figura 42).

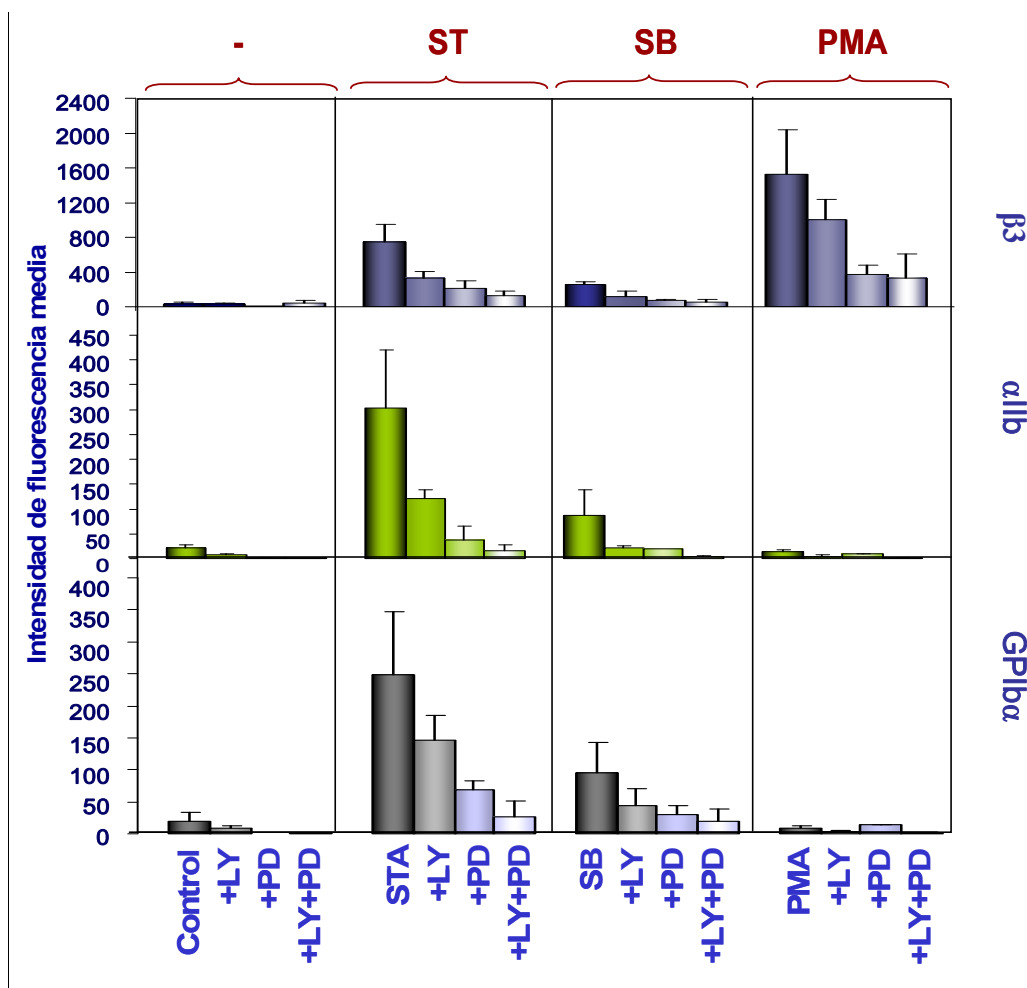


**Figura 42. Efecto combinado de los inhibidores sobre la expresión de marcadores de diferenciación.** Las células K562 se incubaron durante 3 días con estaurosporina (STA) 20 nM, SB 202190 10 $\mu$ M, y PMA 2 nM, o con distintas combinaciones de los inductores. La expresión en superficie de los marcadores de diferenciación se estimó por citometría de flujo con anticuerpos anti- $\beta 3$  (H1AG11) y anti-GPIb $\alpha$  (AK2). Los resultados son medias  $\pm$  SD de 3 experimentos.

### 1.1.10. Reversión de diferenciación por el inhibidor de fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K) LY294002.

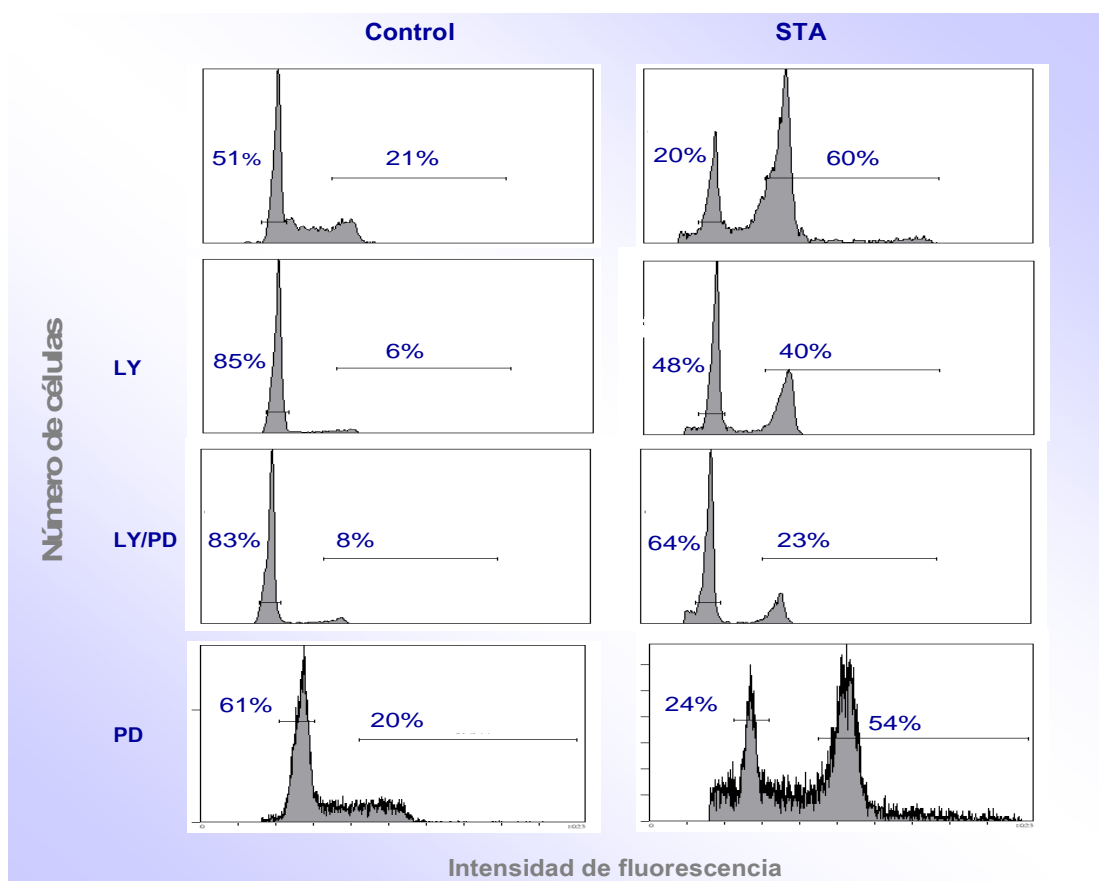
Considerando que estudios recientes han demostrado que la estimulación con trombopoyetina de células que expresan su receptor, c-Mpl, conduce a la activación de la ruta de

señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) (Rojnuckarin *et al.*, 2001; Chanprasert *et al.*, 2006), evaluamos el efecto de la inhibición de PI3-K con el inhibidor LY 294002, en la diferenciación megacariocítica de células K562 inducida por estaurosporina, SB 202190 y PMA. Seguimos el mismo diseño experimental utilizado para determinar el efecto del inhibidor de ERK (PD 98059). La figura 43, muestra cómo LY 294002 revirtió la expresión de marcadores de superficie inducida por estaurosporina, SB 202190 y PMA, siendo la inhibición más acusada en las células estimuladas con SB. En las células tratadas con PMA o STA, el efecto bloqueante de LY 294002 es significativamente menor que el producido por el inhibidor de ERK1/2, PD 98059, que se analizó en paralelo en esta serie de experimentos. Como se observa en la figura 43, la combinación de ambos inhibidores tiene un efecto aditivo.



**Figura 43.** Efecto de los inhibidores de PI3K (LY294002) y de MEK1 (PD98059) sobre la expresión de marcadores de diferenciación en células K562 inducida por estaurosporina (STA), SB202190 (SB) o por PMA. Se dispensaron  $1,5 \times 10^5$  células K562 en pocillos individuales con medio DMEM al 1% de suero y tras dos horas en incubador de  $CO_2$  se incubaron con LY294002  $5 \mu M$  y/o PD98059  $20 \mu M$  durante 2 horas. Las células se trataron después con los inductores de diferenciación a las concentraciones ya indicadas. A los tres días de tratamiento se determinó mediante citometría de flujo la expresión en superficie de GPIb $\alpha$ ,  $\alpha IIb$  y  $\beta 3$ .

Estos resultados sugieren que tanto la activación de la vía de señalización de ERK1/2 como la de PI3-K están involucradas en la expresión de los marcadores de superficie que se produce durante la diferenciación de las células K562 por PMA, STA y SB. Hemos mencionado anteriormente que sólo en las células tratadas con STA se aprecia la poliploidización característica de las etapas finales de la maduración megacariocítica. En la figura 44, se observa que el tratamiento con LY294002, pero no con PD98059, previene la ploidía inducida por STA, lo cual sugiere que la ruta de activación de PI3-K, pero no la de la MAPK ERK1/2, tiene un papel en el proceso de endomitosis durante la maduración megacariocítica.

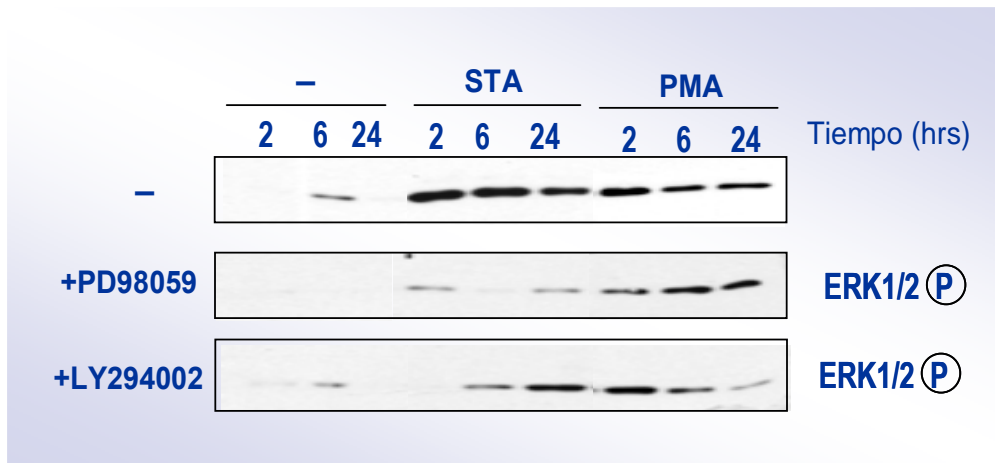


**Figura 44. Análisis de ploidía mediante valoración del ciclo celular por citometría de flujo.** Efecto del pretratamiento con PD98059 o LY294002 sobre la ploidía inducida por STA tras tres días de tratamiento. Los resultados muestran un experimento representativo.

En otros modelos de activación celular se ha demostrado conexión entre estas dos vías de señalización (Jacob *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 2006; Wiseman *et al.*, 2007). Analizamos, por tanto, el estado de fosforilación de ERK1/2 en condiciones en que la diferenciación inducida por PMA o STA está inhibida por LY294002. Los resultados indican que, en presencia de LY294002, está parcialmente disminuída la fosforilación de ERK1/2 inducida tanto por STA como por PMA

(Figura 45). Como hemos mencionado previamente, la activación de ERK inducida por STA muestra una sensibilidad mayor que la estimulada por PMA al efecto inhibitor de PD98059.

Nuestros resultados indican que sólo la estimulación con STA induce poliploidización en las células K562, efecto que en gran medida está mediado por la activación de PI3-K. Dado que esta vía de señalización está también activada durante el proceso de diferenciación desencadenado por PMA y SB, se puede deducir que dicha activación es requisito necesario pero no suficiente para el proceso de endocitosis.



**Figura 45. Evaluación del patrón de fosforilación de ERK1/2 en los pretratamientos con LY294002 +/- PD98059.** Dispensamos  $1.5 \times 10^5$  células K562 en pocillos individuales con medio DMEN con suero fetal bovino al 1%, y tras 2 horas se añadieron al medio los inhibidores LY294002 ó PD98059. 2 horas después se comenzó el tratamiento con estaurosporina (STA) o el éster de forbol (PMA) a las concentraciones ya mencionadas. Al cabo de 2, 6 y 24 horas de tratamiento con los inductores, las células se lisaron en tampón Laemmli 2x/ $\beta$ -mercaptoetanol y las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y la fosforilación de ERK1/2 se determinó mediante análisis de western con el anticuerpo anti-fosfo-p44/42 MAPK.

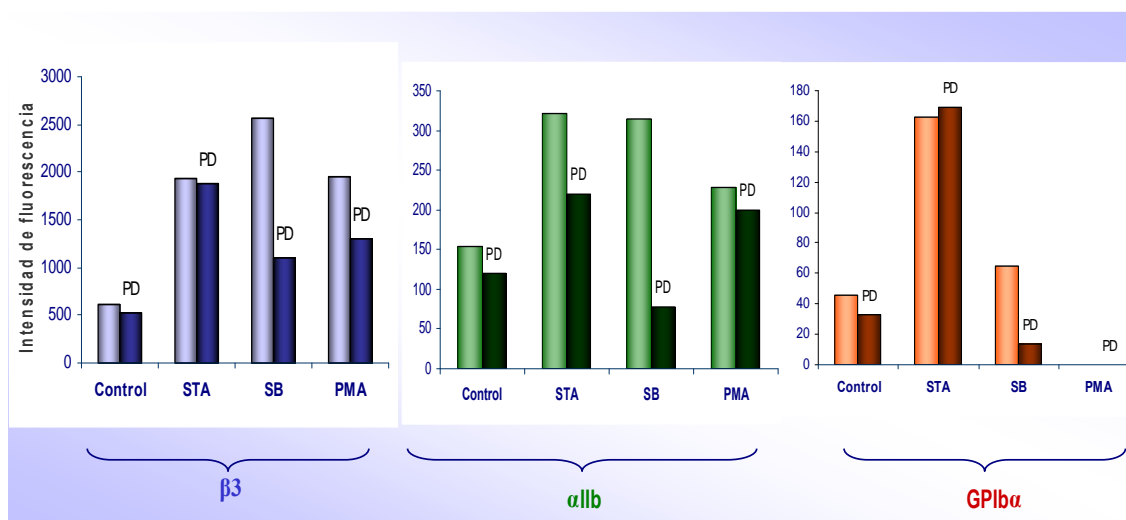
## 1.2. Diferenciación de células Meg-01

### 1.2.1. Diferenciación megacariocítica en células Meg-01 mediante tratamiento con estaurosporina, SB 202190 o ésteres de forbol (PMA).

La línea celular Meg-01, establecida a partir de una leucemia megacarioblástica humana (Ogura *et al.*, 1985), ha sido muy utilizada como modelo en estudios de diferenciación megacariocítica. Consideramos conveniente analizar si en estas células se reproducen los resultados obtenidos en el estudio de la diferenciación de la línea K562. Las células Meg-01 tienen una expresión basal de  $\beta 3$  y  $\alpha IIb$  superior a las células K562. La incubación con STA, SB y PMA conduce a un incremento de la expresión de estos marcadores y del marcador tardío GPIb $\alpha$ ; sin embargo, el grado de respuesta no sigue el patrón que se observa en las células K562.

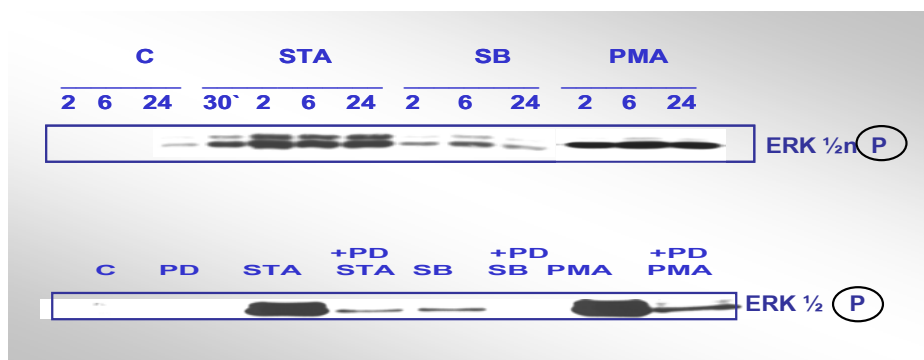
En las células Meg-01, los mayores niveles de expresión de  $\beta 3$  se obtienen tras la incubación con SB 202190, siendo similar la expresión inducida por STA y PMA son algo menores. Con los tres inductores se detecta un incremento similar y discreto de la expresión de  $\alpha IIb$ , y sólo STA incrementa de forma significativa la expresión de GPIb $\alpha$  (Figura 46).

La inducción de la diferenciación megacariocítica en células Meg-01 no fue tan notoria como la observada en células K562, puesto que, como ya mencionamos, las células Meg-01 están más diferenciadas y expresan de forma constitutiva las subunidades  $\alpha IIb$  y  $\beta 3$ .



**Figura 46. Efecto del inhibidor PD98059, sobre la diferenciación megacariocítica en células Meg-01, inducida por estaurosporina (STA), SB 202190 o PMA.**  $1 \times 10^5$  células Meg-01 se incubaron en 500  $\mu$ L de medio RPMI 1% suero durante 2 horas, posteriormente se incubaron otras 2 horas en presencia o ausencia de PD98059 (20  $\mu$ M). A continuación, las células se trataron con 10 nM de estaurosporina, 5  $\mu$ M de SB 202190, 1 nM de PMA. Tres días después se evaluó por citometría de flujo, la expresión en superficie de  $\beta 3$  (H1AG11),  $\alpha IIb$  (2BC1) y GPIb $\alpha$  (AK2), experimentos representativos.

La estimulación de las células Meg-01 por STA y PMA se acompaña de aumento sostenido de la fosforilación de ERK1/2, efecto que es bloqueado por el tratamiento previo con el inhibidor PD98059 (Figura 47). Sin embargo, en estas células el inhibidor de ERK1/2 tiene una capacidad muy reducida para bloquear el efecto de los agentes diferenciadores. El mayor grado de inhibición, de alrededor del 50%, se detecta en las células estimuladas con SB (Figura 46).



**Figura 47. Efecto del pretratamiento con PD 98059 sobre fosforilación de ERK1/2 en células Meg-01 tras el tratamiento con estaurosporina (STA), SB 202190 (SB) y esteres de forbol (PMA).** Aproximadamente  $1 \times 10^5$  células Meg-01 se incubaron en medio RPMI con suero fetal bovino al 1% durante dos horas y tras añadir al medio PD98059, se incubaron otras dos horas antes de añadir los inductores: 10nM de estaurosporina (STA), 5  $\mu$ M de SB202190 (SB) y 1 nM de esteres de forbol (PMA). A las 2, 6 y 24 horas de tratamiento, las células se lisaron en tampón Laemmli 2x/ $\beta$ -mercaptoetanol y se resolvieron en geles SDS-PAGE al 10% para análisis de western blot utilizando un anticuerpo anti-ERK1/2 fosforilado.

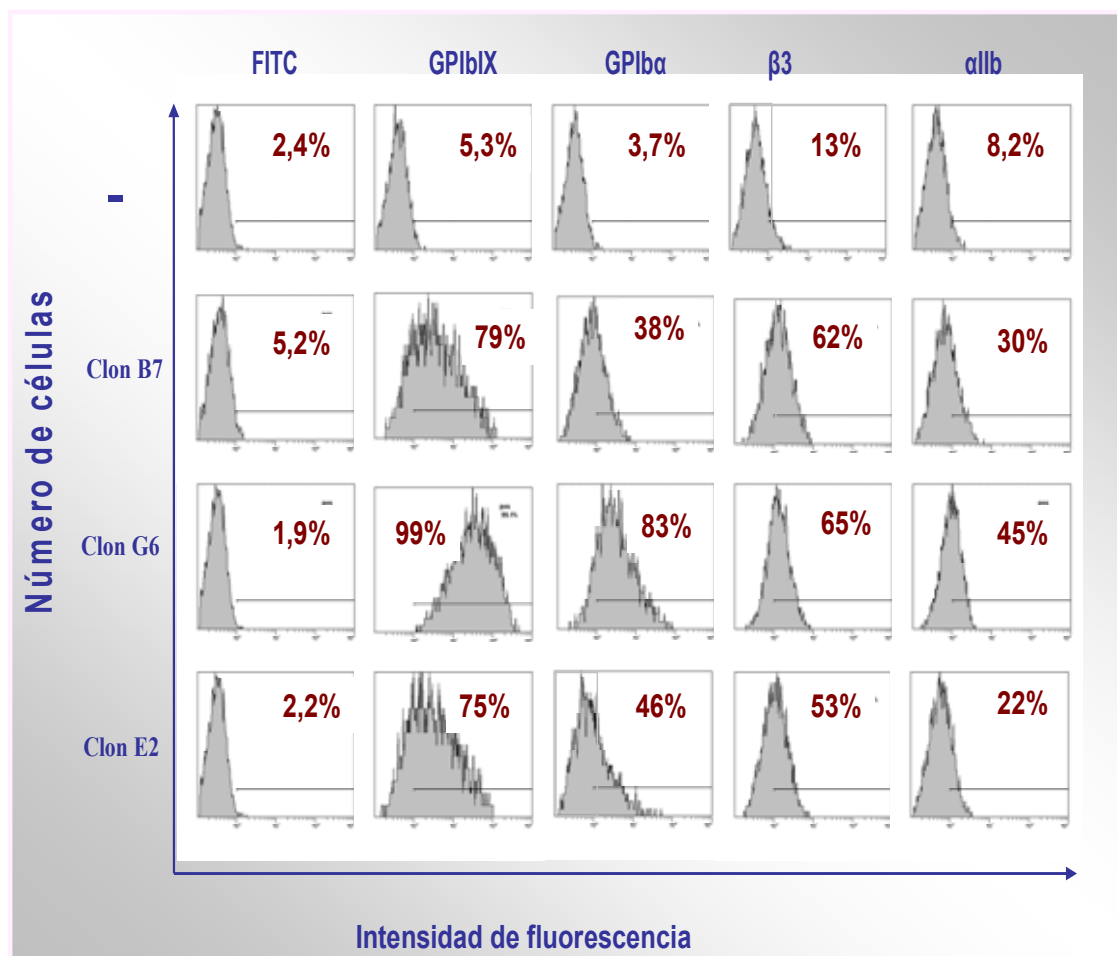
## 2. Maduración terminal megacariocítica mediante la generación de transfectantes estables que sobreexpresan las proteínas que conforman el complejo GPIb-IX

En el segundo abordaje para estudiar el papel del complejo GPIbIX en los procesos de diferenciación y Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de GPIb $\alpha$  en células de mamífero se acompaña de inhibición de proliferación (*Kanaji et al.*, 2004), analizamos si la sobreexpresión de de las proteínas del complejo GPIb-IX serían capaz de inducir el proceso de diferenciación megacariocítica. Por tal razón, sobreexpresamos de forma estable las proteínas del complejo GPIb-IX en células K562 y Meg-01.

### 2.1. Generación de clones con sobreexpresión estable del complejo GPIb-IX en células K562.

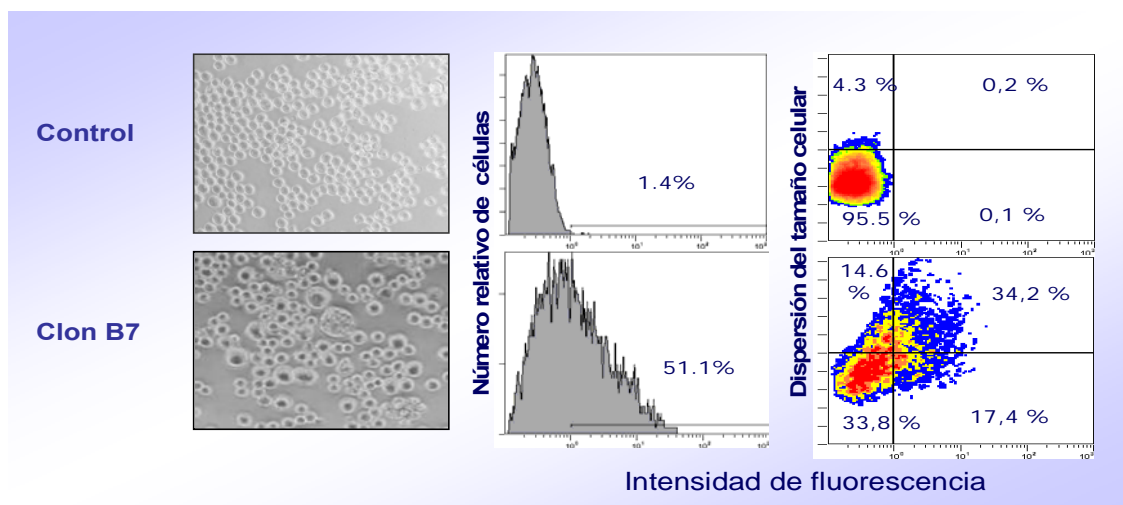
La generación de clones con sobreexpresión de GPIb-IX la realizamos usando el protocolo de nucleofección de Amaxa, con la que obtuvimos una expresión de un 70-80% tanto de GPIb $\alpha$  (AK2) como de GPIb-IX (SZ1) a las 48 horas. Posteriormente, mediante selección con geneticina y separación de células mediante “cell sorting” obtuvimos varios transfectantes que difieren en el grado de maduración celular, lo cual se refleja en el tamaño de las células y en la expresión basal del marcador  $\beta$ 3.

En la figura 48, mostramos el análisis por citometría de flujo de la expresión de subunidades del complejo GPIbIX y de marcadores precoces de diferenciación, como  $\alpha$ IIb y  $\beta$ 3. De los clones que expresaron complejos GPIbIX, destacamos tres de ellos, los clones B7, E2 y G6.



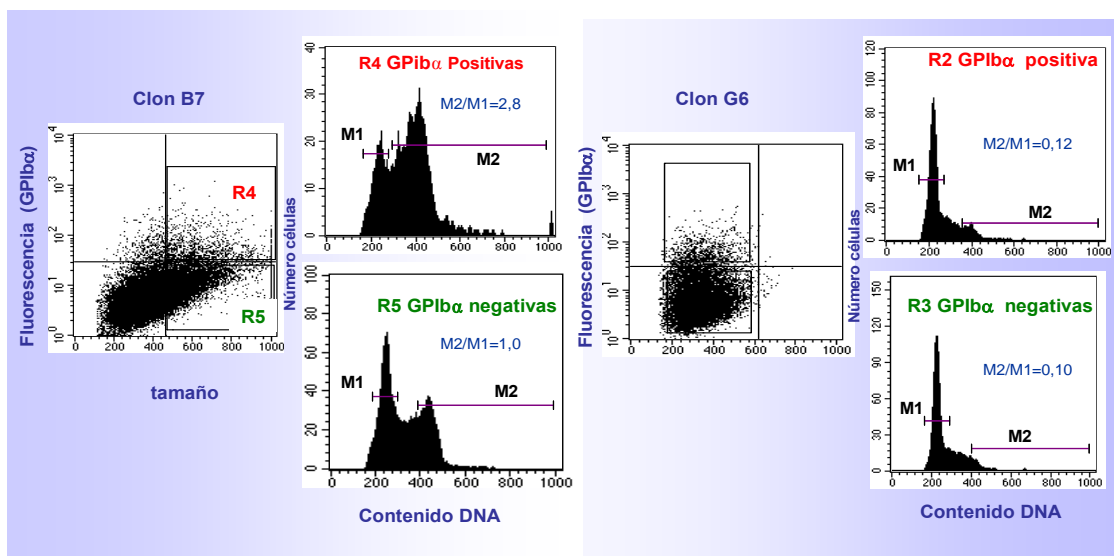
**Figura 48. Generación de clones que sobreexpresan las proteínas del complejo GPIbIX en células K562.** Determinación por citometría de flujo de la expresión de las proteínas de los complejos  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIbIX en los clones B7, G6 y E2 de células K562.

Observamos que la presencia de la subunidad GPIb $\alpha$  confiere inestabilidad en la expresión del complejo en superficie, lo cual podría indicar que existe una selección negativa de las células que expresan GPIb $\alpha$ . Mediante un doble marcaje con HOECHST y con el anticuerpo anti-GPIb $\alpha$  (AK2 ó SZ2) pudimos determinar que, en los clones de células más grandes (y probablemente más maduras), la población de células que expresan GPIb $\alpha$  tiene considerablemente aumentada la ploidía con respecto a las células negativas para dicho marcador (Figura 49). Sin embargo, esto no ocurre en los clones de células más inmaduras, más pequeñas, donde no hay diferencias entre las poblaciones positivas y negativas para GPIb $\alpha$ . Los resultados sugieren que sólo en células con un determinado grado de maduración la expresión de GPIb $\alpha$  desencadenaría una diferenciación megacariocítica.



**Figura 49. Distribución del tamaño celular y la relación con la expresión de GPIb $\alpha$ .** Composición de la apreciación microscópica del fenotipo y evaluación por citometría de flujo de la expresión de GPIb $\alpha$  y tamaño de las células K562 transfectadas con las proteínas del complejo GPIb-IX. El marcaje se realizó con el anticuerpo SZ2 que reconoce GPIb $\alpha$ .

Aunque, como hemos mencionado anteriormente, la maduración citoplásmica y la endomitosis parecen ser procesos regulados independientemente, estos experimentos indicarían que, de alguna forma, el proceso de ploidía en la maduración del megacariocito está regulado por la expresión del complejo GPIb-IX. Resultados que apoyan esta idea han sido recientemente publicados en un modelo de ratón transgénico para una mutante de GPIb $\alpha$  (Kanaji *et al.*, 2004).



**Figura 50. Análisis de la ploidía de las células del clon B7 y G6 mediante doble marcaje con Hoechst y con el anticuerpo que reconoce la proteína GPIb $\alpha$ .** Los resultados demuestran que las células con mayor expresión de GPIb $\alpha$  tienen mayor tamaño y aumento en la ploidía.



## **2.2. Generación de transfectantes de células Meg-01 con sobreexpresión de las proteínas silvestres del complejo GPIb-IX.**

En cuanto a la generación de transfectantes estables en células Meg-01, se intentaron varios métodos de transfección incluidos la precipitación con fosfato cálcico, transfección con dextrano-cloroquina, compuestos lipídicos del tipo de lipofectamina y nucleofección con "Amaxa". Con este último método, logramos optimizar un protocolo de transfección con el que logramos obtener una eficiencia inicial del 50-60 % a las 24 y 30-40% a las 48 horas, pero tras numerosos intentos, no conseguimos seleccionar clones resistentes a geneticina que expresaran en superficie el complejo GPIb-IX.

Se han descrito que la sobreexpresión de GPIb $\alpha$  en células de mamífero produce inhibición del crecimiento celular por un mecanismo no aclarado (*Kanaji et al., 2004*). No podemos descartar, por tanto, que la sobreexpresión de GPIb $\alpha$  en estas células induzca un fenotipo de diferenciación terminal en el que, además de anular la proliferación se estimule la apoptosis conduciendo a una contra-selección de la expresión de GPIb $\alpha$ , imposibilitando pues la obtención de clones estables.

## ***DISCUSIÓN***

## 5. DISCUSIÓN.

### 5.1. Interacción del complejo GPIIb-IX (receptor de factor de von Willebrand) con el receptor de fibrinógeno ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3)

El complejo GPIIb-IX es un receptor de trombina (Okamura *et al.*, 1978; Harmon y Jamieson 1986; Weeterings *et al.*, 2005). Por tal razón, recientemente se ha analizado si la trombina pudiera contribuir a la activación del receptor de fibrinógeno a través de la interacción con el complejo GPIIb-IX, además de su acción mediada por receptores de superficie activados por proteasas PAR1 y PAR4. Estos estudios se han realizado siguiendo dos estrategias fundamentales, el uso de plaquetas con receptores PAR desensibilizados (Soslau *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2003) o la utilización de trombina inactiva (Ramakrishnan *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2003). Este tipo de análisis, probablemente el único posible usando plaquetas, tiene las limitaciones inherentes al solapamiento funcional de cada una de las vías de estimulación, por lo que los resultados de los mecanismos moleculares precisos involucrados en la respuesta no son concluyentes. Por tal razón, y con el objetivo de caracterizar las consecuencias funcionales de la interacción de la trombina con GPIIb-IX diseñamos un nuevo modelo utilizando células CHO, que normalmente no expresan receptores de agonistas y en las que reconstituimos los receptores GPIIb-IX y  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 con proteínas recombinantes. En plaquetas, el efecto de la trombina a concentraciones altas está principalmente mediado por los receptores PAR-1 y PAR-4, mientras que el efecto mediado por la interacción con el complejo GPIIb-IX parece darse a concentraciones bajas. A este respecto, cada vez existen más evidencias que indican la importancia del equilibrio entre la trombina circulante y el receptor GPIIb-IX en el mantenimiento de la hemostasia (Weeterings *et al.*, 2006; Clemetson KJ., 2007). Básicamente en nuestro estudio hemos analizado el efecto de concentraciones crecientes de trombina en la unión de fibrinógeno marcado con FITC a células CHO que expresaban de forma estable los complejos GPIIb-IX y/o  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 de plaquetas humanas; resaltando que las concentraciones de trombina usadas en nuestros experimentos son muy bajas y menores que las utilizadas en los experimentos realizados con plaquetas (Soslau *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2003). Es de destacar, además, que la metodología utilizada para estudiar esta ruta en plaquetas es complicada, puesto que el efecto sobre los receptores PAR enmascaran los efectos de la ruta trombina-GPIIb-IX. Como demostramos en los experimentos de la figura 23, los efectos de los receptores PAR en las células CHO no interfieren significativamente en el objetivo de nuestro estudio, por lo que éste sistema celular se convierte en un modelo útil para llevarlo a cabo.

En condiciones normales el receptor de fibrinógeno sólo muestra activación “total” (capaz de fijar fibrinógeno y producir agregación celular) cuando recibe señales de un receptor de agonista a través del interior de la célula (señalización dentro-fuera). No obstante, trabajos previos realizados en este laboratorio han demostrado que el receptor recombinante  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expresado en células CHO podría ser activado de forma completa cuando en las mismas células se expresaba y activaba un receptor recombinante de agonistas (Larrucea *et al.*, 2002; Butta *et*

*al.*, 2004). En estos estudios nos basamos para suponer que, si existiera alguna relación funcional entre los receptores GPIIb-IX y  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, la estimulación por trombina de GPIIbIX en células CHO que expresaran ambos receptores, debería producir estimulación del receptor de fibrinógeno mediante eventos de señalización que conllevan a la agregación celular.

La activación de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 la evaluamos mediante la capacidad de las células para fijar fibrinógeno. Usando diferentes agentes bloqueantes e inhibidores específicos, obtuvimos datos que sugieren la operatividad de una ruta de señalización que finalizaría con la fijación de fibrina polimerizante a células que expresan los receptores  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y GPIIbIX. Dichos experimentos nos llevaron a detectar que la estimulación por trombina del receptor GPIIb-IX producía activación del receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mediado por la fijación de fibrina de forma independiente de la concentración de fibrinógeno presente en el medio. Esta conclusión se basa en que dicho efecto no fue detectado en células que expresaban sólo  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 o GPIIb-IX, ni tampoco en células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIIbIX en las que se bloqueó la fijación de trombina a GPIIb $\alpha$  con un anticuerpo monoclonal anti GPIIb $\alpha$  altamente específico para el sitio de unión a la trombina.

La inhibición de la polimerización de la fibrina mediante el péptido glicina-prolina-arginina-prolina (GPRP) o el bloqueo de la acción de la trombina mediante hirudina impidieron el efecto de la trombina, lo que apoya la conclusión de que es fibrina polimerizante y no fibrinógeno lo que se fija a  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. También apoya esta idea el hecho de que sólo se produjera fijación de fibrina a dosis bajas de trombina que producen una conversión lenta de fibrinógeno en fibrina, pero no a concentraciones altas de trombina (200 mU/ml) en las que se forma rápidamente un coágulo de fibrina insoluble asociado con una menor fijación de fibrina a células individuales. También apoya esta conclusión la observación de la disminución acusada del efecto de la trombina cuando las células se añadieron una vez la polimerización de la fibrina ya estaba en marcha. Por otra parte, la fijación de la fibrina no parece estar relacionada con la formación de complejos ternarios GPIIb-IX-trombina-fibrina, mecanismo que podría operar *in vivo* para estabilizar el coágulo sanguíneo (Soslau, *et al.*, 2003), dado que en células CHO-GPIIb-IX, carentes de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, no pudimos apreciar efecto de la trombina sobre la fijación de fibrina.

En contraste con nuestras observaciones previas (Larrucea *et al.*, 2002; Butta *et al.*, 2004), la conformación de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 que permite la fijación de fibrina carece de la capacidad de fijar el anticuerpo monoclonal PAC-1, específico de la forma activa de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 que puede fijar fibrinógeno. Esta observación podría indicar que, en nuestras condiciones experimentales, la estimulación por trombina fuera insuficiente para producir una estimulación total de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 capaz de fijar fibrinógeno. También es probable que la estimulación de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mediada por GPIIb-IX induzca una conformación singular de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 incompatible con la fijación de fibrinógeno.

La agregación dependiente de fibrina ha sido atribuida al hecho de que las plaquetas llegan a atraparse durante la conversión de fibrinógeno a fibrina (Jarvis *et al.*, 2003). Mediante citometría de flujo y análisis microscópico, hemos visualizamos y demostramos que la fijación de la fibrina polimerizante se produce en células individuales, lo que descarta la posibilidad de que la agregación celular inducida por la trombina pudiera ser debida a que las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-

GPIIb-IIIa quedarán atrapadas en la malla de la fibrina. El atrapamiento inespecífico celular en la red de fibrina se observó en nuestras condiciones experimentales cuando usamos altas concentraciones de trombina, debido al aumento de la velocidad de polimerización.

El péptido arginina-glicina-aspartato (RGD), inhibidor competitivo de integrinas (Nagarajan *et al.*, 2007), inhibió la fijación de la fibrina a  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 inducida mediante la estimulación del complejo GPIIb-IIIa por la trombina. Esta observación no es de extrañar dado que algunos de los sitios de fijación a las integrinas quedan expuestos durante la conversión del fibrinógeno a fibrina (Katagiri *et al.*, 1995; Flick *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2005). De igual forma, la fijación de la fibrina fue abolida por el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ 3, P37. Estos resultados apoyan nuestra conclusión de que la agregación celular inducida por la trombina esté mediada por la fijación de la fibrina a la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.

En el caso de las plaquetas, se ha sugerido que la fibrina se fijaría al mismo sitio de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 que el fibrinógeno (Rooney *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2000). Nuestras observaciones no concuerdan con estos resultados, indicando más bien a la vista del resultado obtenido con el anticuerpo PAC-1, que la fibrina se fija en la molécula de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 a un sitio distinto del fibrinógeno.

Como mostramos en las figuras 23 y 24, aunque las células CHO expresan receptores de trombina PAR-1 (Riewald y Ruf, 2001; Majumdar *et al.*, 2004), su actividad endógena y su funcionalidad no parecen estar involucrados en el efecto de la trombina sobre la fijación de la fibrina polimerizante. De hecho, en las células CHO transfectadas con GPIIb-IIIa no pudimos detectar efecto alguno de la trombina. Los datos obtenidos a partir de nuestro sistema celular, donde se expresan los receptores recombinantes, ponen de manifiesto que puede existir un mecanismo de intercomunicación entre los receptores GPIIb-IIIa y  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, en aparente ausencia de interferencias mediadas por la acción de otros receptores como los PAR.

Nuestro siguiente paso ha sido intentar dilucidar el posible mecanismo de señalización que acompaña la fijación de fibrina a la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Dado que la acción de los agonistas en las plaquetas se acompaña de fosforilación de proteínas reguladoras, intentamos averiguar si en nuestro sistema el patrón de fosforilación de proteínas celulares totales sufría alguna variación inducida por la captación de fibrina inducida por trombina. Nuestros resultados indican que con W7, inhibidor de calmodulina, se produce una clara inhibición del efecto de la trombina, lo que sugiere la participación de procesos de fosforilación de proteínas mediados por la acción de quinasas dependientes de calmodulina.

La disminución del efecto de trombina en células que expresan GPIIb $\alpha$  truncada desde el residuo 605 del extremo carboxiterminal, sugiere un papel de la proteína 14-3-3 $\zeta$  en el mecanismo de fijación de fibrina inducido por la trombina. En plaquetas y megacariocitos la proteína 14-3-3 $\zeta$  media numerosos procesos inducidos por GPIIb (Feng *et al.*, 1999; Kanaji *et al.*, 2004). Aunque 14-3-3 $\zeta$  también reconoce un sitio en el dominio citoplasmático de GPIIb $\beta$  nuestros resultados sugieren que la fijación de esta proteína a GPIIb $\beta$  no parece ser señal suficiente para su activación. El anticuerpo monoclonal SZ2 reconoce la secuencia de tirosinas

sulfatadas involucradas en el reconocimiento de la trombina y se ha demostrado que este anticuerpo previene el efecto de trombina en células transfectadas con la proteína silvestre de GPIIb-IIIa. La unión de SZ2 al sitio de reconocimiento de la trombina fue similar en las células transfectadas con la proteína silvestre y mutante de GPIIb-IIIa, sugiriendo que no se ha producido ninguna perturbación estructural importante del dominio extracelular de la proteína en las células que expresan el complejo mutante GPIIb-IIIa(605). No obstante, no sabemos si la interacción de 14-3-3 $\zeta$  con GPIIb-IIIa podría además regular eventos de señalización o modular la fijación de trombina por GPIIb-IIIa, como se ha descrito para el caso de interacción GPIIb-IIIa-VWF (Dai *et al.*, 2005).

La participación de los exositos I y II de la trombina en la interacción trombina-GPIIb-IIIa es objeto de controversias (Vanhoorelbeke *et al.*, 2004). Aunque existen datos estructurales y funcionales que demuestran dicha participación, aún no está claro si las regiones cargadas negativamente de GPIIb-IIIa que contienen residuos sulfatados desempeñan un papel en la interacción con ambos exositos (CeliKel *et al.*, 2003, Dumas *et al.*, 2003). Nosotros analizamos el papel de dichos exositos mediante la utilización de hirudina y heparinas (de alto y bajo peso molecular). La heparina impidió el efecto de trombina sobre la fijación de la fibrina a las células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIIb-IIIa, en presencia de fibrina polimerizante, lo cual indica que el exosito II estaría involucrado en la fijación de la trombina a la GPIIb-IIIa. Sin embargo, no podemos concluir sobre la participación del exosito I dado que, en nuestras condiciones experimentales, el efecto de la hirudina podría estar sólo relacionado con su capacidad para inhibir la polimerización de fibrina.

En las plaquetas, un número escaso de moléculas GPIIb-IIIa, no más del 5% de un total estimado de 25.000 copias/célula, adoptan una conformación de alta afinidad por la trombina. A pesar de esto, existen evidencias de que la interacción GPIIb-IIIa-trombina podría desempeñar un papel importante en la regulación de la hemostasia. Nuestros datos sugieren que este papel podría ser especialmente importante al comienzo del proceso, cuando se están generando cantidades exiguas, casi trazadoras, de trombina (Mann *et al.*, 2003). En tal situación, la señalización dependiente de la interacción trombina-GPIIb-IIIa se estima que sería la primera en actuar (Mazzucato *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos con nuestro modelo celular sugieren la existencia de una ruta de agregación plaquetaria dependiente de la fijación de fibrina a la  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, que se desencadenaría tras la interacción de la trombina con el complejo GPIIb-IIIa. Esta ruta podría representar un mecanismo para mantener un balance "basal" de hemostasis, que operaría sólo a concentraciones de trombina que mantuvieran una tasa de polimerización de fibrina lo suficientemente baja para permitir la fijación de fibrina polimerizante a  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Por tanto, las consecuencias de la interacción trombina-GPIIb-IIIa podrían estar sometidas, *in vivo*, a la influencia de factores tales como cambios en la disponibilidad de trombina o de fibrinógeno en los sitios donde actúan como consecuencia de daño tisular. Creemos que con experimentos adicionales, en condiciones de flujo más próximas a las que prevalecen *in vivo*, podremos establecer conclusiones firmes acerca del papel del complejo GPIIb-IIIa en la activación plaquetaria por trombina.

En resumen, hemos establecido una aproximación metodológica útil para el estudio de la señalización intracelular, consecuencia de la estimulación plaquetaria vía GPIIb-IIIa, mediante un modelo experimental que nos ha permitido desvelar la existencia de una vía alternativa de agregación plaquetaria desencadenada por la interacción de la trombina con el complejo GPIIb-IIIa. Nuestros resultados demuestran que dicha activación depende de la fijación de fibrina polimerizante a la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ , que adquiriría una conformación activa adecuada para fijar fibrina más que fibrinógeno.

## 5.2. Papel del complejo GPIb-IX en la regulación de la diferenciación megacariocítica

En el proceso de diferenciación megacariocítica se reconoce la expresión de la integrina  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 como marcador temprano, mientras que las proteínas del complejo GPIbIX, que aparecen en las fases finales de diferenciación, se reconocen como marcadores tardíos pues su aparición coincide con el proceso de endoreduplicación del megacariocito (Uzan *et al.*, 1991; Dekker *et al.*, 2003). Con el fin de estudiar los mecanismos moleculares de señalización involucrados en el proceso de diferenciación megacariocítica, hemos establecido una serie de modelos basados en el tratamiento de células K562 y Meg-01 con varios inductores de diferenciación: la estaurosporina (STA), el derivado piridinil imidazol SB202190 y el éster de forbol PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). En estos modelos celulares hemos analizado una serie de parámetros fenotípicos (morfología y tamaño celular, proliferación, expresión en superficie de marcadores del linaje megacariocítico, ploidía celular, y formación de partículas pseudoplaquetarias) y su relación con la activación de determinadas rutas de señalización.

La línea celular K562 procede de un paciente con leucemia mieloide crónica (Lozzio & Lozzio, 1977) y es portadora de la translocación 9;22, conocida como cromosoma Filadelfia. Estas células crecen en cultivos en suspensión y poseen una gran plasticidad para expresar propiedades relacionadas con distintos linajes hematopoyéticos, por lo que han sido ampliamente utilizadas como modelo de diferenciación leucémica. Compuestos como hemina, butirato sódico e hidroxurea, inducen su diferenciación hacia el linaje eritroide y, por otra parte, su estimulación con el éster de forbol PMA ha sido reportada como modelo de diferenciación megacariocítica (Tsiftoglou *et al.*, 2003). Sin embargo, desde las primeras publicaciones (Rosson 1995; Giltay *et al.*, 1988) en la literatura existen múltiples discrepancias sobre la identidad de los marcadores de superficie inducidos por PMA en estas células.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los compuestos PMA, STA y SB 202190, inducen en las células K562 propiedades fenotípicas distintas, siendo la expresión de la subunidad  $\beta$ 3 el único rasgo común. En nuestras condiciones experimentales, la mayor expresión de  $\beta$ 3 se produce en las células tratadas con PMA, pero en estas células no detectamos incremento alguno de la subunidad  $\alpha$ IIb. Cabe mencionar aquí que, aunque las dos subunidades de la integrina se consideran marcadores tempranos en el proceso de maduración del megacarioblasto, se cree que la expresión de  $\alpha$ IIb es más lenta. Nuestros resultados están en consonancia con observaciones anteriores de otros autores que demuestran disociación de la expresión de  $\alpha$ IIb y  $\beta$ 3 en estas células, similar a la que se observa en las células endoteliales (Kieffer *et al.*, Blood 1988). La expresión de ambas subunidades como rasgo de diferenciación megacariocítica en respuesta a PMA, que se ha venido reportando en sucesivos trabajos (Racke *et al.*, 1997; Shelly *et al.*, 2000; Jacquelin *et al.*, 2006), podría deberse al uso de anticuerpos que reconocen moléculas similares a  $\alpha$ IIb sintetizadas por las líneas celulares. En cualquier caso, el fenotipo inducido por PMA en las células K562 se ha considerado “megacariocítico” en base a la expresión de  $\beta$ 3. En las células tratadas con el éster de forbol (PMA) tampoco detectamos la presencia de GPIb $\alpha$  y GPIX, componentes del complejo GPIb-IX, que aparecen en una etapa



posterior del proceso de diferenciación. Por otra parte, la gran mayoría de las células no sufren endomitosis y muestran cambios morfológicos consistentes en aumento de la relación citoplasma/núcleo, desplazamiento del núcleo por la aparición de vacuolas, y superficie celular irregular por la proyección de lamelipodios. De acuerdo con otros autores (Lerga *et al.*, 1999), consideramos que el fenotipo global se asemeja más a la morfología típica de la estirpe monocito-macrófago. Otras propiedades del megacarioblasto, como el incremento de la peroxidasa plaquetaria y del número de receptores de tromboxano A<sub>2</sub>, se han descrito también en este modelo de diferenciación por lo que, en conjunto, todas estas observaciones indican que el PMA desencadena en las células K562 un fenotipo mieloide con algunas características del megacariocito inmaduro.

La estaurosporina (STA) es un alcaloide de origen microbiano con propiedades antifúngicas descrito por Omura (Omura *et al.*, 1977). Tamaoki y colaboradores describieron su efectividad como inhibidor de la quinasa dependiente de fosfolípido-Ca<sup>2+</sup>, proteína quinasa C (Tamaoki *et al.*, 1986). Los primeros trabajos que demuestran la asociación de estaurosporina con PKC datan del año 1998 (Wolf y Baggiolini, 1988). Aunque su efecto sobre la expresión de algunos marcadores megacariocíticos en líneas leucémicas se conoce desde hace tiempo (Yen *et al.*, 1993; Rubin *et al.*, 2003), en este trabajo presentamos datos que, por primera vez, demuestran que la estimulación con STA induce en las células K562 el fenotipo del megacariocito maduro, que incluye la expresión del marcador de diferenciación terminal GPIb-IX, el aumento de ploidía, y la liberación de partículas pseudoplaquetarias. Consideramos, por tanto, que éste es el mejor modelo de los establecidos hasta ahora con líneas celulares para el estudio de la megacariopoyesis *in vitro*. Ninguno de los otros inhibidores de PKC utilizados en este trabajo estimuló la diferenciación megacariocítica de células K562. La obtención de estos resultados, aparentemente, paradójicos, tiene precedentes. En su descripción original, Omura y colaboradores (1997) señalaron que la STA inhibía otras quinasas. Mientras que años antes ya se había descrito que la STA era capaz de inducir diferenciación de células de neuroblastoma (Slack *et al.*, 1992). Más recientemente se ha observado que este compuesto tiene efectos agonistas sobre PKC en queratinocitos (Dlugosz y Yuspa, 1991), y a concentraciones de 10 nM inducen en estas células la expresión de marcadores de diferenciación característicos, en menos de 24 horas. También se han descrito efectos de STA sobre proliferación celular y sobre fosforilación de proteínas del ciclo celular (Matsumoto y Sasaki, 1989; Gadbois *et al.*, 1992; Lawrie *et al.*, 1997). En definitiva, a lo largo de los últimos años la STA se ha revelado como un inhibidor de diversas quinasas, pudiendo interferir en diversos procesos fisiológicos, dependiendo del tipo celular, y su efecto predominante inhibiendole una u otra quinasa.

También, por primera vez, se reporta en este estudio la capacidad del compuesto SB 202190, potente inhibidor de la actividad de la MAPK p38 (Davies *et al.*, 2000), para inducir, a dosis bajas, la expresión de marcadores megacariocíticos de superficie, tanto tempranos como tardíos. Sin embargo, ni la morfología celular ni la ploidía de las células K562 resultan alterados a las concentraciones de SB 202190 utilizadas. Nuestros datos difieren de los reportados por

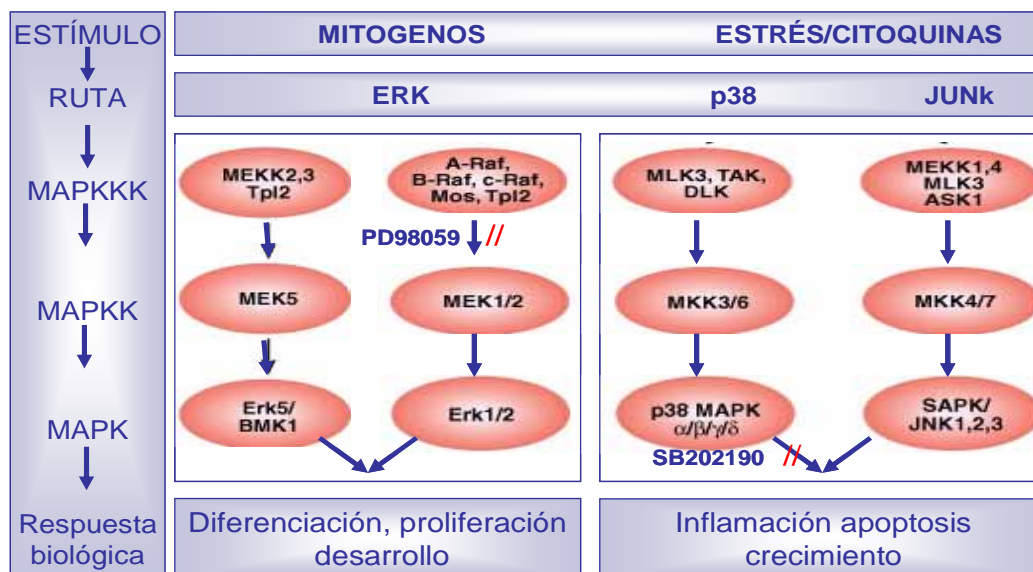
Jacquel y colaboradores (Jacquel *et al.*, 2006), que no observan expresión de marcadores en células tratadas con SB 202190.

Con la disponibilidad de estos tres modelos de diferenciación (STA, SB 202190 y PMA), que comparten algunas características comunes, consideramos de gran interés intentar establecer la relación entre los distintos fenotipos celulares y la actividad de las rutas de señalización que podrían participar tanto en desencadenar la diferenciación megacariocítica como en la progresión hacia el fenotipo del megacariocito maduro. Nos hemos centrado, sobre todo, en las rutas de las quinasas MAP ERK1/2, p38 y en la vía de la PI3-K, debido a que existen datos en la literatura que indican su participación en la diferenciación del megacariocito (Neve, *et al.*, 2002; King, *et al.*, 1997).

### Papel de la ruta de la MAPK ERK1/2 en la diferenciación de células K562

Las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos) son complejos enzimáticos conservados a lo largo de la evolución activados por señales extracelulares, y capaces de provocar respuestas biológicas celulares como progresión del ciclo celular, diferenciación, muerte programada (Reffas & Schlegel, 2000). La actividad MAPK se regula a través de una cascada compuesta por tres niveles o módulos funcionales concatenados: MAPK, MAPK quinase (MEK ó MAPKK), y MEK quinase (MEKK ó MAPKKK) (English *et al.*, 1999; Cano y Mahadevan, 1995) Figura 56. Cada uno de estos módulos puede ser activados por proteínas fijadoras de trifosfato de guanosina (GTP), receptores unidos a proteína G triméricas (Gutkind, 2000; Chang y Karin, 2001).

La familia de proteínas MAPKs fosforilan en serina/treonina mediando respuestas a múltiples estímulos extracelulares como citoquinas y factores de crecimiento. El estado de fosforilación de estas quinasas se considera un índice fidedigno de su actividad (Herrant *et al.*, 2002). Esta familia incluye, entre otros, el grupo de proteína-quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1 y 2) y dos grupos de proteína-quinasas activadas por estrés: las tres quinasas JNK, (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases) y las cuatro MAPK p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). La ruta de señalización de ERK1/2 se relacionó inicialmente con procesos básicamente mitogénicos, pero en los últimos años se ha demostrado su participación en diferentes modelos de diferenciación, entre ellos, la diferenciación neuronal y megacariocítica (Goldfarb, 2005). Hoy parece claro que, aunque la ruta de ERK está normalmente activada, la consecuencia biológica de esta señal en una determinada célula, es decir, proliferación o diferenciación, viene determinada por diferencias cualitativas en la amplitud y duración de dicha activación. El papel de la activación de ERK en la megacariopoyesis se ha demostrado en la diferenciación inducida por trombopoyetina (TPO) tanto de células primarias (Kamata *et al.*, 2004) como de líneas celulares leucémicas que expresan el receptor de TPO, c-mpl (García *et al.*, 2001).



**Figura 55.** Proteínas quinasas activadas por Mitógenos o MAPK y sitios de inhibición de PD98059 y SB202190. Se han desarrollado inhibidores específicos que bloquean la cascada de señalización, se resalta el inhibidor PD98059 y SB202190, que bloquean específicamente la ruta de señalización de ERK y p38 respectivamente en los sitios señalados de la ruta.

En nuestro estudio, la expresión de los marcadores de superficie inducida por PMA y STA en las células K562 es, aparentemente, dependiente de la fosforilación sostenida de ERK1/2 que producen dichos tratamientos, como sugieren los experimentos con el inhibidor de MEK1, PD98059. Sin embargo, los mecanismos por los que estos inductores activan ERK son diferentes. El éster de forbol (PMA) y la STA son, respectivamente, activador e inhibidor de la proteína quinasa C (PKC). Recientemente, se ha reportado que la fosforilación de ERK1/2 y diferenciación de las células K562 inducidas por PMA son procesos selectivamente mediados por las denominadas isoformas nuevas de PKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ ) (Jacquel *et al.*, 2006). En consonancia con esos resultados, la reducción parcial de la expresión de  $\beta 3$  que observamos en las células tratadas simultáneamente con ambos inductores podría deberse a la inhibición por STA de algunas de las formas de PKC implicadas en la respuesta a PMA. En contraste, la diferenciación inducida por STA no parece estar mediada por su capacidad para inhibir PKC, tal como sugiere la falta de efecto de los otros inhibidores de PKC utilizados en este trabajo. No podemos descartar que el efecto de STA esté mediado, en parte, por su capacidad para inhibir otras quinasas, como PKA y PKG (Goodnight *et al.*, 1994). Por otra parte, en sucesivos experimentos observamos que en las células tratadas con PD98059, inhibidor específico de MEK1, la reversión del fenotipo inducido por PMA no se asocia a una disminución de la fosforilación de ERK comparable a la que se observa en los tratamientos con STA realizados en paralelo. Hasta el momento no tenemos una explicación para este hallazgo; una posibilidad es que el PMA fosforile ERK, al menos en parte, a través de un mecanismo alternativo diferente a la

activación por MEK1/2, como se ha descrito en otros modelos celulares (Pimienta & Pascual, 2007).

En nuestras condiciones experimentales, el tratamiento de las células K562 con SB 202190 induce la expresión no sólo de  $\beta 3$  sino también de  $\alpha IIb$  y GPIIb $\alpha$ , aunque en menor cuantía que el STA. La expresión de marcadores no se asocia a un incremento de la fosforilación de ERK pero, paradójicamente, es bloqueada cuando las células son preincubadas con el inhibidor PD98059.

Nuestros datos indican, pues, que la expresión de marcadores megacariocíticos de superficie es dependiente de la actividad de la ruta de señalización de ERK. Sin embargo, no apoyan las conclusiones de otros autores que señalan que la activación de ERK es requisito suficiente para la diferenciación megacariocítica (Melemed *et al.*, 1997). Por otra parte, la activación sostenida de esta quinasa no parece ser un requerimiento indispensable en este proceso, en contra de lo reportado en estudios previos (Racke *et al.*, 1997; García *et al.*, 2001).

Estas conclusiones no excluyen, como hemos mencionado anteriormente, que la fosforilación sostenida de esta MAPK sea determinante en la inducción de diferenciación por PMA o STA. Los experimentos en que el inhibidor PD98059 se añade a diferentes tiempos demuestran que su efectividad para bloquear la expresión de  $\beta 3$  comienza a disminuir cuando se incorpora a partir de las 24 de tratamiento con los inductores, el tiempo que aproximadamente se mantiene elevada la fosforilación de ERK. La expresión de GPIIb $\alpha$  en las células estimuladas por STA muestra, sin embargo, una dependencia más prolongada de la actividad de ERK. No creemos que esto se deba a que la aparición de GPIIb $\alpha$  en la superficie de estas células esté muy retrasada en el tiempo con respecto a la aparición de  $\beta 3$ . Aunque no todas las células tratadas con STA expresan GPIIb $\alpha$ , pudimos comprobar que los patrones de poblaciones positivas para uno y otro marcador son similares desde las primeras 24 horas de tratamiento (resultados no mostrados). La mayor sensibilidad de GPIIb $\alpha$  al bloqueo por PD 98059 podría, pues, indicar que la expresión de este marcador está sometida a regulación transcripcional permanentemente dependiente de la actividad de ERK. La expresión de marcadores inducida por PMA o STA no requiere la presencia continua del agente inductor; pocas horas de incubación son suficientes para que las células expresen los marcadores de superficie en cuantía similar a la de células tratadas durante tres días. Por otra parte, el medio “acondicionado” por estas células durante tres días tiene también capacidad para inducir la expresión de marcadores, efecto que también es bloqueado por PD98059. Estos resultados podrían indicar que la fosforilación sostenida de ERK, responsable de la diferenciación inducida por PMA y STA, se mantiene a través de una ruta autocrina de secreción.

En las células Meg-01, que tienen rasgos fenotípicos del megacariocito inmaduro (Ogura *et al.*, 1985), la estimulación de la expresión de marcadores por PMA y STA es, en proporción, mucho menor que en las células K562 y no está mediada por el aumento sostenido de ERK, como lo indica la escasa capacidad del inhibidor PD98059 para bloquear la expresión de marcadores, tanto basal como estimulada. Estas observaciones indican que las células Meg-01

se hallan en una fase de diferenciación donde la activación de esta ruta de señalización no tiene un papel regulador. En conjunto, los resultados sugieren que el papel de la activación sostenida de ERK podría estar limitado a una etapa muy inicial en el programa de diferenciación megacariocítica.

El mecanismo molecular implicado en la diferenciación de las células K562 por SB 202190 no incluye fosforilación sostenida de ERK, pero una actividad basal de esta ruta parece requerirse, al menos, durante los tres primeros días del tratamiento. En las células Meg-01, los niveles más elevados de expresión de  $\beta 3$  se obtienen con el tratamiento con SB 202190, y el inhibidor de ERK PD98059 sí tiene capacidad para bloquear este efecto. Creemos que estas observaciones son compatibles con la coexistencia de rutas alternativas que activarían subpoblaciones celulares en distintas fases del proceso de diferenciación, como recientemente han sugerido otros autores (Pang *et al.*, 2005).

A pesar de que son numerosas las evidencias que señalan la ruta de ERK como regulador importante de la diferenciación megacariocítica, existe poca información sobre las moléculas dianas que median los efectos biológicos de esta señalización. Se ha reportado que la activación de ERK regula el promotor de  $\alpha IIb$  a través de la interacción de los factores de transcripción GATA, Ets y MafB/Kreisler (Sevinsky *et al.*, 2004). Por otra parte, el trabajo de Eisbacher y colaboradores (2001) sugiere que en células UT-7 estimuladas por TPO, la expresión de la subunidad GPIX es mediada por la fijación del factor de transcripción Ets. En nuestro estudio, la diferenciación de las células K562 por PMA y STA se acompaña también de fosforilación de JNK y, como resultado inesperado, el efecto de STA es en gran medida bloqueado por el inhibidor de ERK PD98059. Esta observación tiene precedentes en la literatura y podría indicar interconexión de las cascadas de señales de ERK y JNK (Salh *et al.*, 2000). Ambas MAPKs intervienen en el control transcripcional de algunos de los componentes del complejo AP-1, que regula la expresión de la integrina  $\alpha 2 \beta 1$  durante la diferenciación megacariocítica, según un estudio de Eriksson *et al.* (2005).

### Papel de la vía de señalización de la PI3-K

Los resultados de este trabajo indican que la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) tiene también un papel importante en la diferenciación de las células K562. La activación de esta vía por trombopoyetina (TPO) ha sido previamente reportada en células que expresan el receptor de esta citoquina, c-mpl (Rojnuckarin *et al.*, 2001; Chanprasert *et al.*, 2006). La expresión de  $\beta 3$ ,  $\alpha IIb$  y GPIIb $\alpha$  experimenta una marcada disminución cuando las células se incuban en presencia de LY294002, inhibidor de la actividad de PI3-K, aunque el grado de inhibición es menor que el que se obtiene bloqueando la activación de ERK con PD98059. La combinación de ambos inhibidores tiene un efecto aditivo, reduciendo en algunos casos la expresión de los marcadores de superficie a los valores de las células no tratadas. Ambas rutas de señalización participarían, por tanto, en la expresión de marcadores megacariocíticos que acompaña al fenotipo de diferenciación inducido por PMA, STA y SB202190 en estas células.

La disminución de la fosforilación de ERK que se observa en las células incubadas con LY294002 indica que la activación de ERK inducida por PMA y STA es, al menos en parte, dependiente de PI3-K, como recientemente se ha descrito en otros modelos experimentales (Romano *et al.*, 2006; Wiseman *et al.*, 2007). Existen precedentes de la implicación de la actividad de PI3-K en la fosforilación de ERK mediada tanto por Raf-1 como por Rap1 (York *et al.*, 2000; Jacob *et al.*, 2002). Aunque se ha postulado que las señales transducidas via Ras/Raf-1 tienden a causar activación transitoria de ERK y las procesadas por la ruta paralela Rap1/B-Raf activación sostenida (Goldfarb, 2005), la participación de ambas rutas parece ser necesaria en la activación sostenida de ERK inducida por TPO (García *et al.*, 2001). Concluyendo, aunque aún no conocemos el mecanismo de la interacción entre ERK y PI3-K, nuestros resultados sugieren que la convergencia de ambas rutas de señalización en la activación de ERK podría tener un importante papel en la regulación del proceso de diferenciación megacariocítica.

Las rutas de ERK y PI3-K no creemos, sin embargo, que tengan el mismo grado de participación en todas las características fenotípicas del proceso de diferenciación megacariocítica. Según nuestros resultados, el bloqueo de ERK atenúa los rasgos morfológicos de las células diferenciadas por PMA y STA, pero no impide ni la ploidía ni el aumento de tamaño celular inducidos por STA; en contraste, estos dos últimos efectos de STA son parcialmente dependientes de la actividad de PI3-K. Por otra parte, el hecho de que la vía de señalización de PI3-K esté activada durante el proceso de diferenciación inducido por los tres inductores, sugiere que dicha activación es requisito necesario pero no suficiente para el proceso de endomitosis que tiene lugar en la etapa final de la maduración. Se ha sugerido que las señales generadas por TPO para inducir endomitosis podrían ser procesadas sólo por megacariocitos con un determinado grado de madurez (Ravid, *et al.*, 2002); por tanto, también es posible que sólo las células diferenciadas por STA puedan responder a la activación de PI3-K que conduce al aumento de ploidía. Entre las dianas de PI3-K, la mejor investigada es AKT, que media la activación de varias rutas involucradas en supresión de apoptosis y supervivencia (Datta, *et al.*, 1999). mTOR, diana de AKT, regula la quinasa ribosomal S6 p70 (p70S6K), implicada en la regulación del ciclo celular durante la fase G1, que parece estar significativamente acortada en los ciclos endomitóticos. Nuestros resultados están, pues, en consonancia con los reportados por Guerriero y colaboradores (2006) que observan que el tratamiento con rapamicina, inhibidor específico de mTOR, impide la poliploidización de células CD34+ purificadas de sangre humana.

### Papel de la ruta de la MAPK p38

Recientemente, en un modelo de diferenciación megacariocítica consistente en el tratamiento de células K562 con la combinación de PMA y SB202190, los autores proponen que además de la activación de las vías de ERK y JNK, la inhibición de la MAPK p38 juega un papel esencial (Jacquel A *et al.*, 2006). En nuestras condiciones experimentales, el inhibidor de p38 SB 202190 induce la expresión de  $\beta 3$ ,  $\alpha IIb$  y GPIIb $\alpha$  en las células K562, efecto que no se acompaña de

incremento de la fosforilación de ERK1/2, sugiriendo que la mera inhibición de p38 podría ser suficiente para desencadenar diferenciación megacariocítica.

Por otra parte, la estimulación de las células K562 por STA y PMA se acompaña de fosforilación de p38, con características diferenciales dependiendo del inductor. La fosforilación producida por STA dura pocas horas, mientras que la fosforilación inducida por PMA es más prolongada y podría obedecer a un mecanismo alternativo de activación de la p38, mediado por autofosforilación, dado que es inhibida por SB 202190. No podemos descartar, pues, que el patrón de activación de p38 sea determinante en la evolución del fenotipo desencadenado por la activación de ERK.

Durante el proceso de maduración *in vitro* de líneas celulares leucémicas, una fracción de las células diferenciadas sufren apoptosis (muerte celular programada). Se desconoce si este proceso, que se ha denominado apoptosis dependiente de diferenciación (ADD), se activa simultáneamente durante la maduración celular, formando parte del programa de desarrollo de las células leucémicas (Tsiftoglou *et al.*, 2003). La muerte por apoptosis, dependiente o no de caspasas, se ha venido considerando también el destino fisiológico normal del megacariocito diferenciado maduro (De Botton *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2003). Los tratamientos con PMA y STA se acompañan de un importante porcentaje de células apoptóticas y también, aunque menor, de células muertas por necrosis (resultados no mostrados). Dado que el grado de expresión de  $\beta 3$  y GPIIb no varía significativamente en las células diferenciadas dependiendo de su grado de viabilidad, no podemos afirmar que en estas células la muerte sea una consecuencia inmediata de su diferenciación terminal.

Como hemos comentado, la inhibición de la actividad de p38 regula de forma positiva la expresión de  $\beta 3$ . El tratamiento simultáneo con SB202190 incrementa de forma notable la expresión de  $\beta 3$  inducida por STA. La expresión de  $\beta 3$  por PMA aumenta también en las células tratadas, pero no de forma significativa en las co-estimuladas con SB202190. Esto último podría guardar relación con el notable incremento de muerte celular que se observa en las células tratadas simultáneamente con estos dos inductores, que ha sido también reportada en un estudio previo (Jacquel A *et al.*, 2006).

### Papel del complejo GPIIb-IX en la maduración del megacariocito

De nuestro segundo abordaje de diferenciación megacariocítica en las que la transfección de las subunidades del complejo GPIIb-IX en células K562, observamos que la presencia de la subunidad GPIIb confiere inestabilidad a la expresión del complejo en superficie, lo cual podría indicar que existe una selección negativa de las células que expresan GPIIb. Observamos que en los clones de células más grandes (posiblemente más maduras), la población de células que expresa GPIIb tiene considerablemente aumentada la ploidía con respecto a las células negativas para dicho marcador. Estos datos indican por primera vez que la sobreexpresión de las proteínas de los complejos GPIIb-IX, podría acelerar la maduración terminal en células con un determinado grado de diferenciación. Aunque, como hemos planteado anteriormente, la

maduración citoplásmica con expresión de marcadores y la endomitosis parecen ser procesos regulados independientemente, nuestros experimentos indican que, de alguna forma, el proceso de ploidía en la maduración del megacariocito está regulado o se encuentra vinculado con la expresión del complejo GPIb-IX. Esta afirmación sería reforzada con los resultados obtenidos por Kanaji y colaboradores (2004) en un modelo de ratones transgénicos para una mutante de la proteína GPIb $\alpha$ .

En cuanto a la generación de transfectantes estables de células Meg-01, no conseguimos seleccionar ningún clon con expresión estable del complejo en superficie, posiblemente por una contraselección de las células que expresan la proteína GPIb $\alpha$ . En consonancia con esta observación, se ha descrito que la sobreexpresión de GPIb $\alpha$  en células de mamífero produce inhibición del crecimiento celular por un mecanismo no aclarado (Kanaji *et al.*, 2004; Feng S *et al.*, 1999). Es posible que la sobreexpresión de GPIb $\alpha$  en estas células promueva un fenotipo de diferenciación terminal que anule la proliferación imposibilitando en consecuencia la obtención de clones estables.



## ***CONCLUSIONES***

## 6. CONCLUSIONES.

Los resultados experimentales de este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

### A. Estudio de las consecuencias funcionales de la interacción trombina-GPIbIX en un modelo celular reconstituido.

1. La interacción entre el receptor recombinante GPIb-IX y la trombina en nuestro modelo celular induce activación del receptor de fibrinógeno (integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3), lo cual sugiere una vía de activación celular que “conectaría” ambos receptores. Este efecto se observa a concentraciones bajas de trombina (16-100 mU/mL) y es específico pues: 1) es saturable al aumentar la concentración de fibrinógeno; 2) es bloqueado por anticuerpos anti-GPIb $\alpha$  y anti- $\beta$ 3; y 3) no ocurre en las células que sólo expresan GPIb-IX, descartando por tanto la formación de complejos ternarios de GPIbIX-trombina-fibrinógeno en la membrana.
2. La activación de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 conlleva la unión de “fibrina polimerizante”, pero no de fibrinógeno, puesto que el efecto de la trombina no se detecta cuando se inhibe el proceso de polimerización de fibrina con el péptido GPRP (glicina-prolina-arginina-prolina), o cuando la actividad catalítica de la trombina se bloquea con hirudina. Por otra parte, los resultados obtenidos con el anticuerpo PAC-1, característicamente vinculado a la activación “clásica” y completa del receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, sugieren que la conformación de la integrina unida a fibrina polimerizante es diferente a la que adopta para fijar fibrinógeno. Sin embargo, nuestros datos indican que la secuencia RGD, presente en el fibrinógeno, participa en la unión puesto que es bloqueada por péptidos sintéticos conteniendo dicha secuencia.
3. La inhibición por heparina del efecto de la trombina sobre la fijación de fibrina a células CHO- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-GPIbIX indica que el exosito II de la trombina estaría implicado en su interacción con la GPIb $\alpha$ .
4. La respuesta celular a la interacción trombina-GPIbIX no se debe a simple atrapamiento celular por la red de fibrina. Dicha respuesta conlleva señalización intracelular pues es bloqueada por inhibidores específicos de la actividad calcio-calmodulina. Por otra parte, el bloqueo del efecto de la trombina en células portadoras de GPIb $\alpha$  truncada incapaz de interaccionar con la proteína 14-3-3 $\zeta$ , sugiere la participación de esta proteína adaptadora en la ruta de señalización. Sin embargo, la activación de la ruta de la MAP quinasa ERK1/2, reportada en plaquetas como consecuencia de la interacción de la trombina con sus receptores PAR, no parece estar involucrada en la respuesta caracterizada en este modelo celular.

5. En conjunto, los resultados de este trabajo apoyan una forma alternativa de activación plaquetaria, inducida por la trombina a través del complejo GPIb-IX, y que conduciría a la unión de fibrina polimerizante a la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ .

B. Regulación de la expresión y papel del complejo GPIb-IX en el proceso de diferenciación megacariocítica:

1. Hemos establecido modelos de diferenciación megacariocítica basados en el tratamiento de células K562 y Meg-01 con estaurosporina (STA), SB 202190 y PMA. En nuestras condiciones experimentales, estos compuestos inducen propiedades fenotípicas distintas, siendo la expresión de la subunidad  $\beta 3$  el único rasgo común. Este trabajo muestra, por primera vez, que la STA induce un fenotipo similar al del megacariocito maduro, que incluye la expresión del marcador de diferenciación terminal GPIb-IX, el aumento de ploidía, y la liberación de partículas pseudoplaquetarias, siendo pues el mejor modelo de los establecidos hasta ahora con líneas celulares para el estudio de la megacariopoyesis *in vitro*. También, por primera vez, se reporta en este estudio la capacidad del SB 202190, inhibidor de la MAP quinasa p38, para estimular la expresión de marcadores megacariocíticos de superficie, tanto tempranos como tardíos.
2. Los resultados de los experimentos con el inhibidor PD98059 sugieren que la expresión de los marcadores megacariocíticos de superficie es dependiente de la actividad de la ruta de señalización de la MAP quinasa ERK1/2. Sin embargo, los datos no apoyan las conclusiones de otros autores que señalan que la activación de ERK1/2 es requisito suficiente para la diferenciación megacariocítica. Por otra parte, la activación sostenida de esta quinasa no parece ser indispensable para la expresión de estos marcadores de diferenciación, en contra de lo reportado en estudios previos.
3. La expresión de marcadores inducidos por PMA o STA no requiere la presencia continua del agente inductor; pocas horas de incubación son suficientes para que las células expresen los marcadores de superficie. Estos resultados podrían indicar que la fosforilación sostenida de ERK1/2, durante la diferenciación inducida por PMA y STA, se mantiene a través de una ruta autocrina de secreción.
4. Los experimentos con el inhibidor LY294002 indican que la actividad fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) está también involucrada en la expresión de los marcadores megacariocíticos inducida por PMA, STA y SB 202190 en estas células. La activación de ERK1/2 inducida por PMA y STA es, al menos en parte, dependiente de dicha actividad.

5. Los resultados indican que la inhibición de ERK1/2, además de reducir la expresión de los marcadores de superficie, atenúa los rasgos morfológicos de las células diferenciadas por PMA y STA, pero no impide ni la ploidía ni el aumento de tamaño celular inducidos por STA; en contraste, estos dos últimos efectos de STA son, en gran medida, dependientes de la actividad de PI3-K. Por tanto, aunque ambas rutas, ERK y PI3-K, tienen un papel en la diferenciación inducida por PMA, STA y SB 202190 en estas células, no tienen el mismo grado de participación en todas las características fenotípicas del proceso de diferenciación megacariocítica.
6. Aunque la maduración citoplásmica y la endomitosis parecen ser procesos regulados independientemente, los experimentos de sobreexpresión estable del complejo GPIb-IX indican que, de alguna forma, el proceso de ploidía en la maduración del megacariocito está regulado por la expresión de dicho complejo. Por otra parte, la inhibición del crecimiento celular y/o la inducción de un fenotipo de diferenciación terminal mediadas por la sobreexpresión de GPIb $\alpha$  podrían explicar la imposibilidad de mantener de forma estable la expresión del complejo GPIb-IX en estas líneas celulares.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

## 7. BIBLIOGRAFIA.

- Adam F., Guillin MC., Jandrot-Perrus M. (2003). Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *Eur J Biochem.* 270: 2959-70.
- Adam F., Bouton MC., Huisse MG., Jandrot-Perrus M. (2003). Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib $\alpha$ . *Trends in Molecular medicine.* 9(11):461-464.
- Adam F., Verbeuren TJ., Fauchere JL., Guillin MC., Jandrot-Perrus M. (2003). Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. *J Thromb Haemost.* 1: 798-804.
- Adams TE., Huntington JA. (2006). Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(8):1738-45. Review.
- Aleman M., Concord E., Garin J., Vincon M., Giles A., Marguerie G., Gulino D. (1996). Sequence 274-368 in the b3-subunit of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 provides a ligand recognition and binding domain for the g-chain of fibrinogen that is independent of platelet activation. *Blood.* 87: 592-601.
- Andrews RK. Fox JE. (1992). Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein. *J Biol Chem.* 267:18605-18611.
- Andrews RK., Shen Y., Gardiner EE., Dong JF., Lopez JA., Berndt MC. (1999). The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost.* 82(2):357-64. Review.
- Andrews RK., Harris SJ., McNally T., Berndt MC. (1998). Binding of purified 14-3-3 zeta signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Biochemistry.* 37(2):638-47.
- Andrews RK., Munday AD., Mitchell CA., and Berndt MC. (2001). Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood.* 98:681-687.
- Andrews Robert., Lopez Jose A., Berndt Michael. (1997). Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29(1): 91-105.
- Avraham H & Price DJ. (1999). Regulation of megakaryocytopoiesis and platelet production by tyrosine Kinases and tyrosine phosphatases. *Academia Press.* 17:250-264.
- Balduini CL., Iolascon A., Savoia A. (2002). Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy. *Haematologica.* 87(8):860-80. Review.

- Battinelli E., Willoughby SR., Foxall T., Valeri CR., Loscalzo J. (2001). Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(25):14458-63.
- Belkin AM., Tsurupa G., Zemskov E., Veklich Y., Weisel JW., Medved L. (2005). Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) alphaC domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling. *Blood*. 105(9):3561-8.
- Bennett JS. (2005). Structure and function of the platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ . *J Clin Invest*. 115(12):3363-9. Review.
- Bergmeier W., Piffath CL., Goerge T., Cifuni SM., Ruggeri ZM., Ware J., Wagner DD. (2006). The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci*. 103(45):16900-5.
- Bernard J, Soulier JP. (1948). Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire-hémorragique congénitale. *Semin Hop Paris*. 24:3217.
- Berndt MC., Shen Y., Doppeide SM., Gardiner EE., Andrews RK. (2001). The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost*. 86(1):178-88. Review.
- Berndt MC., Gregory C., Dowden G., Castaldi PA. (1986). Thrombin interactions with platelet membrane proteins. *Ann NY Acad Sci*. 485:374-86.
- Berndt MC, Gregory C., Chong BH, Zola H, Castaldi PA. (1983). Additional glycoprotein defects in Bernard-Soulier's syndrome: Confirmation of genetic basis by parental analysis. *Blood*. 62:800-807,
- Bialkowska K., Zaffran Y., Meyer SC., Fox JEB. (2003). 14-3-3 $\zeta$  mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. *J Biol Chem*. 278: 33342-50.
- Bodnar RJ., Xi X., Li Z., Berndt MC., Du X. (2002). Regulation of glycoprotein Ib-IX-von Willebrand factor interaction by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation at Ser 166 of glycoprotein Ib(beta). *J Biol Chem*. 277(49):47080-7.
- Bombeli T., Schwartz BR., Harlan JM. (1998). Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),  $\alpha\text{v}\beta_3$  integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med*. 187(3):329-39.
- Bonnefoy A., Hantgan R., Legrand C., Frojmovic MM. (2001). A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor. *J Biol Chem*. 276(8):5605-12.
- Bonnefoy A., Liu Q., Legrand C., Frojmovic MM. (2000). Efficiency of platelet adhesion to fibrinogen depends on both cell activation and flow. *Biophys J*. 78(6):2834-43.

- Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C. (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 4: 487-525.
- Butta N., Larrucea S., Gonzalez-Manchon C., Alonso S., Parrilla R. (2004). Alpha-Adrenergic-mediated activation of human reconstituted fibrinogen receptor (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) in Chinese hamster ovary cells. *Thromb Haemost.* 92(6):1368-76.
- Caen JP., Rosa JP. (1995). Platelet-vessel wall interaction: from the bedside to molecules. *Thromb Haemost.* 74(1):18-24. Review.
- Calderwood DA. (2004). Integrin activation. *J Cell Sci.* 117(Pt 5):657-66. Review.
- Calverley DC., Terrance J K., Roth GJ. (1998). Human signaling protein 14-3-3 $\zeta$  interacts with platelet glycoprotein Ib subunits Ib $\alpha$  and Ib $\beta$ . *Blood.* 91(4):1295-303.
- Calvete JJ., Henschen A., y González-Rodríguez J. (1991). Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIb/IIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem J.* 274(1):63-71.
- Calvete JJ. (2004). Structures of integrin domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Exp Biol Med (Maywood).* 229(8):732-44. Review.
- Calzada MJ, Alvarez MV, González-Rodríguez J. (2002). Agonist-specific structural rearrangements of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Confirmation of the bent conformation in platelets at rest and after activation. *J Biol Chem.* 277: 39899–908.
- Cano, E. and Mahadevan LC. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci.* 20:117-122.
- Canobbio I., Balduini C., Torti Mauro. (2004). Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cellular Signaling.* 16:1329-1344.
- Celikel R., McClintock RA., Roberts JR., Mendolicchio GL., Ware J., Varughese KI., Ruggeri ZM. (2003). Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ib $\alpha$ . *Science.* 301:218-21.
- Chang, L. and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410: 37- 40.
- Chanprasert S., Geddis AE., Barroga C., Fox NE., Kaushansky K. (2006). Thrombopoietin (TPO) induces c-myc expression through a PI3K- and MAPK-dependent pathway that is not mediated by Akt, PKC $\zeta$  or mTOR in TPO-dependent cell lines and primary megakaryocytes. *Cell Signal.* 18(8):1212-8.
- Charo IF., Nannizzi L., Phillips DR., Hsu M. y Scarborough RM. (1991). Inhibition of fibrinogen binding to GPIIb/IIIa by GPIIIa peptide. *J Biol Chem.* 266:1415-1421.



- Chen X., Lowe M., Herliczek T., Hall MJ., Danes C., Lawrence DA., Keyomarsi K. (2000). Protection of normal proliferating cells against chemotherapy by staurosporine-mediated, selective, and reversible G(1) arrest. *J Natl Cancer Inst.* 92(24):1999-2008.
- Cho J., Degen JL., Collier BS., Mosher DF. (2005). Fibrin but not adsorbed fibrinogen supports fibronectin assembly by spread platelets. Effects of the interaction of alphaIIb beta3 with the C terminus of the fibrinogen gamma-chain. *J Biol Chem.* 280(42):35490-8.
- Choi HJ., Park YG., Kim CH. (2007). (Lactosylceramide alpha2,3-sialyltransferase is induced via a PKC/ERK/CREB-dependent pathway in K562 human leukemia cells. *Mol Cells.* 23(2):138-44.
- Clarke MC., Savill J., Jones DB., Noble BS., Brown SB. (2003). Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *J Cell Biol.* 160(4):577-87.
- Clemetson KJ., Clemetson JM. (1994). Molecular abnormalities in Glanzmann's thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, and platelet-type von Willebrand's disease. *Curr Op. Hematol.* 1:388-393.
- Clemetson KJ., Clemetson JM. (1995). Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost.* 21:130-6.
- Clemetson KJ. (2007). A short history of platelet glycoprotein Ib complex. *Thromb Haemost.* 98(1):63-8.
- Coughlin SR. (2001). Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost.* 86:298-307.
- Cranmer SL., Pokovski I., Mangin P., Thompson PE., Domagala T., Frazzetto M. (2005). Identification of a unique filamin A binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Ib. *Biochem. J.* 387: 849-858.
- Dai K, Bodnar R, Berndt MC, Du X. (2005). A critical role for 14-3-3zeta protein in regulating the VWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications. *Blood.* 106(6):1975-81.
- Datta SR., Brunet A., Greenberg ME. (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev. Nov.* 13(22):2905-27. Review.
- Davis RJ. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 103(2):239-52.
- De Botton S., Sabri S., Daugas E., Zermati Y., Guidotti JE., Hermine O., Kroemer G., Vainchenker W., Debili N. (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood.* 100(4):1310-7.
- De Cristofaro R., De Candia E. (2003). Thrombin domains: structure, function and interaction with platelet receptors. *J Thromb Thrombolysis.* 15(3):151-63. Review.

- Dekker E. den., Abel M., van der Vuurst H., Eys GJ., Akkerman JW., Heemskerk JW. (2003). Cell-to-cell variability in the differentiation program of human megakaryocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1643(1-3):85-94
- Deutsch VR., Tomer A. (2006). Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*. 134(5):453-66.
- Dlugosz AA., Yuspa SH. (1991). Staurosporine Induces Protein Kinase C Agonist Effects and Maturation of Normal and Neoplastic Mouse Keratinocytes in Vitro. *Cancer Res*. 51:4677-4684.
- Dong JF., Li CQ., Sae-Tung G., Hyun W., Afshar-Kharghan V., López JA. (1997). The cytoplasmic domain of glycoprotein(GP) Iba constrains the lateral diffusion of the GP Ib-IX complex and modulates von Willebrand factor binding. *Biochemistry*. 36:12421-12427.
- Dorsey JF., Cunnick JM., Mane SM., Wu J. (2002). Regulation of the Erk2-Elk1 signaling pathway and megakaryocytic differentiation of Bcr-Abl(+) K562 leukemic cells by Gab2. *Blood*. 99(4):1388-97.
- Du X., Beutler L., Ruan C., Castaldi PA., Berndt MC. (1987). Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood*. 69:1524-1527.
- Dubois C., Steiner B., Kieffer N., Meyer Reigner SC. (2003). Thrombin binding to GPIIb/IIIa induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 interaction with polymerized fibrin. *Thromb Haemost.*. 89: 853–65.
- Dumas JJ., Kumar R., Seehra J., Somers WS., Mosyak L. (2003). Crystal structure of the GPIIb $\alpha$ -thrombin complex essential for platelet aggregation. *Science*. 301: 222-6.
- Dzamba BJ., Keene DR, Isogai Z., Charbonneau NL., Karaman-Jurukovska N., Simon M., Sakai LY. (2001). Assembly of epithelial cell fibrillins. *J Invest Dermatol*. 117(6):1612-20.
- Eisbacher M., Khachigian LM., Khin TH., Holmes ML., Chong BH. (2001). Inducible expression of the megakaryocyte-specific gene glycoprotein IX is mediated through an Ets binding site and involves upstream activation of extracellular signal-regulated kinase. *Cell Growth Differ*. 12(8):435-45.
- English J., Pearson G., Wilsbacher J., Swantek J., Karandikar M., Xu S., and Cobb M.H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res*. 253: 255-270.
- Englund GD., Bodnar RJ., Li Z., Ruggeri ZM., Du X. (2001). Regulation of von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX by a membrane skeleton-dependent inside-out signal. *J Biol Chem*. 276(20):16952-9.
- Eriksson M., Arminen L., Karjalainen-Lindsberg ML., Leppä S. (2005). AP-1 regulates alpha2beta1 integrin expression by ERK-dependent signals during megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res*. 304(1):175-86.
- Esmon CT. (1993). Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost.* 70:29-35.

- Essex DW., Li M. (1999). Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol.* 104(3):448-54.
- Farrell DH., Thiagarajan P., Chung DW., Davie EW. (1992). Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10729-10732.
- Feng S., Christodoulides N., Kroll MH. (1999). The glycoprotein Ib/IX complex regulates cell proliferation. *Blood.* 93: 4256-63.
- Feng S., Christodoulides N., Reséndiz JC., Berndt MC., Kroll MH. (2000). Cytoplasmic domains of GpIbalpha and GpIbbeta regulate 14-3-3zeta binding to GpIb/IX/V. *Blood.* 95(2):551-7.
- Ferrer M., Ayuso MS., Butta N., Parrilla R., González-Manchón C. (1998). Role of the  $\beta$ -subunit 326GRV sequence in the surface expression of fibrinogen and vitronectin receptors. *Am J Physiol.* 275: 1239-46.
- Fitzgerald LA. y Phillips DR. (1985). Calcium regulation of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 260:11366-11376.
- Fitzgerald LA., Steiner B., Rall SC., Lo SS., Phillips DR. (1987). Protein sequence of endothelial cell glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity with "integrin". *J Biol Chem.* 262: 3936-3939.
- Flick MJ., Du X., Degen JL. (2004). Fibrin(ogen)-alpha M beta 2 interactions regulate leukocyte function and innate immunity in vivo. *Exp Biol Med.* 229: 1105-10.
- Fox JE., Boyles JK., Berndt MC., Steffen PK., Anderson LK. (1988). Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol.* 106:1525-1538.
- Gadbois DM., Hamaguchi JR., Swank RA., Bradbury EM. (1992). Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases. *Biochem and Biophys Res Commun.* 184: 80-85.
- Garcia J., de Gunzburg J., Eychene A., Gisselbrecht S., Porteu F. (2001). Thrombopoietin-mediated sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in UT7-Mpl cells requires both Ras-Raf-1- and Rap1-B-Raf-dependent pathways. *Mol Cell Biol.* 21(8):2659-70.
- George J. (2000). Platelets. *Lancet.* 29;355(9214):1531-9. Review.
- Gilltay JC., Brinkman HJ., Modderman PW., Tetteroo PA., Van Mourik JA.. (1988). Glycoproteins IIb and IIIa in K562 cells. *Blood.* 71(4):1171-2.
- Ginsberg MH., Frelinger AL., Lam SC., Forsyth J., McMillan R., Plow EF., Shattil SJ. (1990). Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. *Blood.* 15;76(10):2017-23.

- Goldfarb AN. (2005). ERK expands its empire. *Leuk Res.* 29(11):1235-6.
- Gonzalez-Manchon C., Butta N, Larrucea S., Arias-Salgado EG., Alonso S., Lopez A., Parrilla R. (2004). A variant thrombasthenic phenotype associated with compound heterozygosity of integrin beta3-subunit: (Met124Val)beta3 alters the subunit dimerization rendering a decreased number of constitutive active alphaIIb beta3 receptors. *Thromb Haemost.* 92; 6, 1377-86.
- Gonzalez-Manchon C., Arias-Salgado EG., Butta N., Martin G., Rodriguez RB., Elalamy I., Parrilla R., Favier R. (2003). A novel homozygous splice junction mutation in GPIIb associated with alternative splicing, nonsense-mediated decay of GPIIb-mRNA, and type II Glanzmann's thrombasthenia. *J Thromb Haemost.* 1; 5, 1071-8.
- Gonzalez-Manchon C., Larrucea S., Pastor AL., Butta N., Arias-Salgado EG., Ayuso MS., Parrilla R. (2001). Compound heterozygosity of the GPIIb gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost.* 86(6):1385-91.
- Goodnight J., Mischak H., Mushinski JF. (1994). Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv Cancer Res.* 64:159-209. Review.
- Guerriero R., Parolini I., Testa U., Samoggia P., Petrucci E., Sargiacomo M., Chelucci C., Gabbianelli M., Peschle C. (2006). Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes. *J Cell Sci.* 15;119(Pt 4):744-52.
- Gulino D., Boudignon C., Zhang LY., Concord E., Rabet MJ., Marguerie G. (1992). Ca(2+)-binding properties of the platelet glycoprotein IIb ligand-interacting domain. *J Biol Chem.* 15;267(2):1001-7.
- Gutkind SJ. (2000). Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE.* 11;2000(40):RE1.
- Harmon JT., Jamieson GA. (1986). The glycolocalicin portion of platelet glycoprotein Ib expresses both high and moderate affinity receptor sites for thrombin. A soluble radioreceptor assay for the interaction of thrombin with platelets. *J Biol Chem.* 261:13224-13229.
- Hartwig JH., DeSisto M. (1991). The cytoskeleton of the resting human blood platelet: Structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol.* 112:407-425.
- Hartwig JH., Italiano JE. (2006). Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol Dis.* 36(2):99-103.
- Hawiger J. (1989). Platelet secretory pathways: an overview. *Methods Enzymol.* 169:191-195.
- Herrant M., Luciano F., Loubat A., Auberger P. (2002). The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. Transcriptional and postranscriptional regulation. *Oncogene.* 21(32):4957-68.

- Herrera R., Hubbell S., Decker S., Petruzzelli L. (1998). A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res.* 1;238(2):407-14.
- Hofmann J. (1997). The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* 11(8):649-69. Review.
- Houdijk WP., Sixma JJ. (1985). Fibronectin in artery subendothelium is important for platelet adhesion. *Blood.* 65:598-604.
- Hu DD., White CA., Panzer-Knodle S., Page JD., Nicholson N., Smith JW. (1999). A new model of dual interacting ligand binding sites on integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J Biol Chem.* 274:4633-4639.
- Huang M., Wang Y., Collins M., Graves LM. (2004). CPEC induces erythroid differentiation of human myeloid leukemia K562 cells through CTP depletion and p38 MAP kinase. *Leukemia*, 18:1857–1863.
- Huntington JA. (2005). Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost.* 3(8):1861-72. Review.
- Hynes R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25
- Italiano JE Jr., Patel-Hett S., Hartwig JH. (2007). Mechanics of proplatelet elaboration. *J Thromb Haemost.* 5;suppl 1:18-23.
- Jacob A., Cooney D., Pradhan M., Coggeshall KM. (2002). Convergence of signaling pathways on the activation of ERK in B cells. *J Biol Chem.* 28;277(26):23420-6.
- Jacquel A., Herrant M., Defamie V., Belhacene N., Colosetti P., Marchetti S., Legros L., Deckert M., Mari B., Cassuto JP., Hofman P., Auberger P. (2006). A survey of the signaling pathways involved in megakaryocytic differentiation of the human K562 leukemia cell line by molecular and c-DNA array analysis. *Oncogene.* 25(5):781-94
- Jarvis GE., Atkinson BT., Frampton J., Watson SP. (2003). Thrombin-induced conversion of fibrinogen to fibrin results in rapid platelet trapping which is not dependent on platelet activation or GPIb. *Br J Pharmacol.* 138: 574-83.
- Jayo A., Pabon D., Lastres P., Jimenez-Yuste V., Gonzalez-Manchon C. (2006). Type II Glanzmann thrombasthenia in a compound heterozygote for the alpha IIb gene. A novel missense mutation in exon 27. *Haematologica.* 91;10:1352-9.
- Kamata T., Pritchard CA., Leavitt AD. (2004). Raf-1 is not required for megakaryocytopoiesis or TPO-induced ERK phosphorylation. *Blood.* 1;103(7):2568-70.

- Kanaji T., Russell S., Cunningham J., Izuhara K., Fox JE., Ware J. (2004). Megakaryocyte proliferation and ploidy regulated by the cytoplasmic tail of glycoprotein Ib $\alpha$ . *Blood*. 104(10):3161-8.
- Kasirer-Friede A, Legrand C, Frojmovic MM. (2001). Complementary roles for fibrin(ogen), thrombospondin and vWF in mediating shear-dependent aggregation of platelets stimulated at threshold thrombin concentrations. *Thromb Haemost.* 86(2):653-9.
- Katagiri Y., Hiroyama T., Akamatsu N., Suzuki H., Yamazaki H., Tanoue K. (1995). Involvement of  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin in mediating fibrin gel retraction. *J Biol Chem*. 270:1785-90.
- Kaushansky K. (2006). Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17(6):423-430.
- Kenny D., Morateck PA., Gill JC., Montgomery RR. (1999). The critical interaction of glycoprotein (GP) Ib $\beta$  with GPIIb-IIIa: a genetic cause of Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 93(9):2968-75.
- Kieffer N., Wautier JL., Coulombel L., Titeux M., Wautier MP., Vainchenker W., Ruan C., Breton-Gorius J. (1988). Uncoupling in the expression of platelet GP IIb/IIIa in human endothelial cells and K562 cells: absence of immunologic crossreactivity between platelet GP IIb and the vitronectin receptor  $\alpha$  chain. *Blood*. 72(4):1209-15.
- King WG., Mattaliano MD., Chan TO., Tsichlis PN., Brugge JS. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol*. 17: 4406-4418.
- Kobe B., Deisenhofer J. (1994). The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*. 19:415-421.
- Kroll MH., Harris TS., Moake JL., Handin RI., Schafer AI. (1991). Von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest*. 88:1568-1573.
- Kulkarni S., Dopheide SM., Yap CL., Ravanat C., Freund M., Mangin P., Heel KA., Street A., Harper IS., Lanza F., Jackson SP. (2000). A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*. 105:783-91.
- Lane David A., Philippou H., Huntington JA. (2005). Directing thrombin. *Blood*. 106(8):2605-2612.
- Lanza François. (2006). Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic platelet dysfunction). *Orphanet J Rare Dis*. 1;46:1-6. Review.
- Larrucea S., González-Manchón C., Butta N., Arias-Salgado EG., Shen L., Ayuso MS., Parrilla R. (2002). Agonist-induced aggregation of Chinese hamster ovary cells coexpressing the human receptors for fibrinogen (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) and the platelet-activating factor: dissociation between adhesion and aggregation. *Blood*. 99: 2819-27.

- Lawrie AM., Noble MEM., Tuna P., Brown NR., Johnson LN., Endicott JA. (1997). Protein kinase inhibition by staurosporine revealed in details of the molecular interaction with CDK2. *Nat Struct Biol.* 10:796-801.
- Leavesley DI., Schwartz MA., Rosenfeld M., Cheresh DA. (1993). Integrin  $\beta$ 1- and  $\beta$ 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol.* 121:163-170.
- Lerga A., Crespo P., Berciano M., Delgado MD., Canelles M., Cales C., Richard C., Ceballos E., Gutierrez .P, Ajenjo N., Gutkind S., Leon J. (1999). Regulation of c-Myc and Max in megakaryocytic and monocytic-macrophagic differentiation of K562 cells induced by protein kinase C modifiers: c-Myc is down-regulated but does not inhibit differentiation. *Cell Growth Differ.* 10(9):639-54
- Li Z., Zhang G., Feil R., Han J., Du X. (2006). Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Blood.* 107: 965-72.
- Liesveld JL., Winslow JM., Frediani KE., Ryan DH., Abboud CN. (1993). Expression of integrins and examination of their adhesive function in normal and leukemic hematopoietic cells. *Blood.* 81(1):112-21.
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci.* 113(20):3563-71. Review.
- Loftus JC., O'Toole TE., Plow EF., Glass A., Frelinger AL., Ginsberg MH. (1990). A  $\beta$ 3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science.* 249:915-918.
- Loftus JC., & Linddington RC. (1997). New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest.* 99:2302-2306.
- Long Michael W., Williams Neil, and Ebbe Shirley. (1982). Immature megakaryocytes in the mouse: Physical characteristics, cell cycle status, and In vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood.* 59(3):569-575.
- Long MW., Heffner CH., Lynne Williams, Peters C., Prochownik EV. (1990). Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J Clin Invest.* 85:1072-1084.
- López JA., Andrews R., Khsrghan V., Berndt Michael. (1998). Bernad-Soulier syndrome. *Blood.* 91(12):4397-4418. Review.
- López JA. (1994). The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 5:97-119.
- Lozzio BB., Lozzio CB. (1977). Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 19(1):136.
- Ma YQ., Qin J., Plow EF. (2007). Platelet integrin  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3): activation mechanisms. *J Thromb Haemost.* 5(7):1345-52. Review.

- Majumdar M., Tarui T., Shi B., Akakuras N., Ruf W., Takada Y. (2004). Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin  $\alpha 9 \beta 1$ . *J Biol Chem.* 279: 37528–34.
- Mangin P., David T., Lavaud V., Cranmer SL., Pikovski I., Jackson SP., Berndt MC., Cazenave JP., Gachet C., Lanza F. (2004). Identification of a novel 14-3-3 $\zeta$  binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ib $\alpha$ . *Blood.* 104(2):420-427.
- Mann KG., Brummel K., Butenas S. (2003). What is all that thrombin for?. *J Thromb Haemost.* 1:1504-14.
- Marcus AJ. (1994). Thrombosis and inflammation as multicellular processes: significance of cell-cell interactions. *Semin Hematol.* 31(4):261-9. Review.
- Marshall SJ., Senis YA., Auger JM., Feil R., Hofmann F., Salmon G., Peterson JT., Burslem F., Watson SP. (2004). GPIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinase or cGMP-dependent kinase. *Blood.* 103: 2601- 2609.
- Matsumoto H & Sasaki Y. (1989). Staurosporine, a protein kinase C inhibitor interferes with proliferation of arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 158:105-109.
- Mazzucato M., DeMarco L., Masotti A., Pradella P., Bahou WF., Ruggeri ZM. (1998). Characterization of the initial  $\alpha$ -thrombin interaction with glycoprotein Ib $\alpha$  in relation to platelet activation. *J Biol Chem.* 273(4):1880-7.
- Mazzucato M., Santomaso A., Canu P., M Ruggeri Z., De Marco L. (2007). Flow dynamics and haemostasis. *Ann Ist Super Sanita.* 43(2):130-138.
- McNamee HP., Ingber DE., Schwartz MA. (1993). Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J. Cell. Biol.* 121:673-678.
- Melemed AS., Ryder JW., Vik TA. (1997). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is involved in and sufficient for megakaryocytic differentiation of CMK cells. *Blood.* 90(9):3462-70.
- Miller JL., Lyle VA., Cunningham D. (1992). Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet glycoprotein Ib $\alpha$  leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood.* 79:439-446.
- Modderman PW., Admiraal LG., Sonnenberg A., Von Dem Borne A. (1992). Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem.* 267:364-369.
- Mohle R., Green D., Moore MA., Nachman RL., Rafli S. (1997). Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 94:663-668.



- Munday AD., Berndt MC., Mitchell CA. (2000). Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta. *Blood*. 96(2):577-84.
- Nagarajan SR., Devadas B., Malecha JW., Lu HF., Ruminski PG., Rico JG., Rogers TE., Marrufo LD., Collins JT., Kleine HP., Lantz MK., Zhu J., Green NF., Russell MA., Landis BH., Miller LM., Meyer DM., Duffin TD., Engleman VW., Finn MB., Freeman SK., Griggs DW., Williams ML., Nickols MA., Pegg JA., Shannon KE., Steininger C., Westlin MM., Nickols GA., Keene JL. (2007 *Blood*). R-isomers of Arg-Gly-Asp (RGD) mimics as potent alphavbeta3 inhibitors. *Bioorg Med Chem*.15(11):3783-800.
- Neve RM, Holbro T, Hynes NE (2002). Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene*. 21(29):4567-76.
- Nichols WC., Ginsburg D. (1997). Von Willebrand disease. *Medicine (Baltimore)*. 76: 1-20.
- Ogura M., Morishima Y., Ohno R., Kato Y., Hirabayashi N., Nagura H., Saito H. (1985). Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, Meg-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 66(6):1384-92.
- Okumura T., Hasitz M., Jamieson GA. (1978). Platelet glycoprotein. Interaction with thrombin and role as thrombin receptor of the platelet surface. *J Biol Chem*. 253:3435-3443.
- Omura S., Iwai Y., Hirano A., Nakagawa A., Awaya J., Tsuchiya H., Takahashi Y., Masuma R. (1977). A new alkaloid AM-2282 of Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J. Antibiot*. 30(4):275-82.
- Pang L., Weiss MJ., Poncz M. (2005). Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest*.115(12):3332-8. Review.
- Parsons, JT. (1996). Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 8:146-52.
- Pasquet J.M, Noury M, Nurden A.T. (2002). Evidence that the platelet integrin alphaIIb beta3 is regulated by the integrin-linked kinase, ILK, in a PI3-kinase dependent pathway. *Thromb Haemost*. 88(1):115-22.
- Patel SR., Hartwig JH., Italiano J. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 115(12):3348-54. Review.
- Perez-Pujol S., Lozano M., Escolar G., Diaz-Ricart M., Pujol-Moix N., Ordinas A. (2003). Glycoproteins expression on platelet membrane in inherited macrothrombocytopenias. *Thromb Res*. 112(4):233-7.
- Pimienta G., Pascual J. (2007). Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle*. 6(21):2628-32. Review.
- Plow EF., D'Souza SE., Ginsberg MH. (1992). Consequences of the interaction of platelet membrane glycoprotein GPIIb-IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) and its ligands. *J Lab Clin Med*. 120:198-204.

- Podolnikova NP., Yakubenko VP., Volkov GL., Plow EF., Ugarova TP. (2003). Identification of a novel binding site for platelet integrins alpha IIb beta 3 (GPIIb/IIIa) and alpha 5 beta 1 in the gamma C-domain of fibrinogen. *J Biol Chem.* 278(34):32251-8.
- Poncz M., Eisman R., Heidenreich R., Silver SM., Vilaire G. et al. (1987). Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb: homology to the a subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem.* 262:8476-8482.
- Poujol C., Ware J., Nieswandt B., Nurden AT., Nurden P. (2002). Absence of GPIbalpha is responsible for aberrant membrane development during megakaryocyte maturation: ultrastructural study using a transgenic model. *Exp Hematol.* 30(4):352-60.
- Raccuglia G. (1971). Gray platelet syndrome. A variety of qualitative platelet disorder. *Am J Med.* 51:818-828.
- Racke FK., Wang D., Zaidi Z., Kelley J., Visvader J., Soh JW., Goldfarb AN. (2001). A potential role for protein kinase C-epsilon in regulating megakaryocytic lineage commitment. *J Biol Chem.* 276:1,522-8.
- Racke FK., Lewandowska K., Goueli S., Goldfarb AN. (1997). Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem.* 272(37):23366-70.
- Ramakrishnan V., DeGuzman F., Bao M., Hall SW., Leung LL., Phillips DR. (2001). A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glucoprotein V. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 1823-8.
- Ramasamy Indra. (2003). Inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. *Oncology Hematology.* 49:1-35.
- Ravid K., Lu J., Zimmet JM., Jones MR. (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol.* 190(1):7-20. Review.
- Reffas S., Schlegel W. (2000). Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells. *Biochem J.* 352 (3):701-8.
- Richardson JL., Shivdasani RA., Boers C., Hartwig JH., Italiano JE Jr. (2005). Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood.* 106(13):4066-75.
- Riewald M., Ruf W. (2001). Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 98(14):7742-7.

- Rojnuckarin P., Miyakawa Y., Fox NE., Deou J., Daum G., Kaushansky K. (2001). The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C $\zeta$  for thrombopoietin-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem.* 276(44):41014-22.
- Romano D., Pertuit M., Rasolonjanahary R., Barnier JV., Magalon K., Enjalbert A., Gerard C. (2006). Regulation of the RAP1/RAF-1/extracellularly regulated kinase-1/2 cascade and prolactin release by the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway in pituitary cells. *Endocrinology.* 147(12):6036-45.
- Rooney MM., Parise LV., Lord ST. (1996). Dissecting clot retraction and platelet aggregation. *J Biol Chem.* 271: 8553-5.
- Rosson D, O'Brien TG. (1995). Constitutive c-myc expression in K562 cells inhibits induced erythroid differentiation but not tetradecanoyl phorbol acetate-induced megakaryocytic differentiation. *Mol Cell Biol.* 15(2):772-9.
- Rubin CI., French DL., Atweh GF. (2003). Stathmin expression and megakaryocyte differentiation: a potential role in polyploidy. *Exp Hematol.* 31(5):389-97.
- Sakariassen KS., Bolhuis PA., Sixma JJ. (1979). Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to subendothelium. *Nature.* 279:636-638.
- Salh BS., Martens J., Hundal RS., Yoganathan N., Charest D., Mui A., Gómez-Muñoz A. (2000). PD98059 attenuates hydrogen peroxide-induced cell death through inhibition of Jun N-Terminal Kinase in HT29 cells. *Mol Cell Biol Res Commun.* 4(3):158-65.
- Savage B., Bottini E., Ruggeri ZM. (1995). Interaction of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion. *J Biol Chem.* 270: 28812-7.
- Savage B., Saldivar E., Ruggeri ZM. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 84:289-297.
- Sevinsky JR., Whalen AM., Ahn NG. (2004). Extracellular signal-regulated kinase induces the megakaryocyte GPIIb/CD41 gene through MafB/Kreisler. *Mol Cell Biol.* 24(10):4534-45.
- Shattil SJ., Bennett JS. (1981). Platelets and their membranes in hemostasis: physiology and pathophysiology. *Ann Intern Med.* 94:108-18.
- Shattil SJ., Ginsberg MH., Brugge JS. (1994). Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol.* 6:695-704.
- Shattil SJ., Kashiwagi H., Pampori N. (1998). Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 91(8):2645-57. Review.

- Shelly C., Petruzzelli LM., Herrera R. (1998). PMA-induced phenotypic changes in K562 cells: MAPK-dependent and -independent events. *Leukemia*. 12:1951–1961.
- Shelly C., Petruzzelli L., Herrera R. (2000). K562 cells resistant to phorbol 12-myristate 13-acetate-induced growth arrest: dissociation of mitogen-activated protein kinase activation and Egr-1 expression from megakaryocyte differentiation. *Cell Growth Differ.* 11(9):501-6.
- Shivdasani RA. (2001). Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells*. 19(5):397-407.
- Shlansky-Goldberg R. (2002). Platelet aggregation inhibitors for use in peripheral vascular interventions: what can we learned from the experience in the coronary arteries?. *J Vasc Interv Radiol*. 13:229-46.
- Sims PJ., Ginsberg MH., Plow EF., Shattil SJ. (1991). Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem*. 266:7345-7352.
- Slack R., Lach B., Gregor A., al-Mazidi H., Proulx P. (1992). Retinoic acid- and staurosporine-induced bidirectional differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res*. 202(1):17-27.
- Soslau G., Class R., Morgan DA., Foster C., Lord ST., Marchese P., Ruggeri ZM. (2001). Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J Biol Chem*. 276: 21173–83.
- Soslau G., Favero M. (2003). The GPIb-thrombin pathway: evidence for a novel role of fibrin in platelet aggregation. *J Thromb Haemost*. 2:522-4.
- Szalai G., LaRue AC., Watson DK. (2006). Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cell Mol Life Sci*. 63:2460-2476.
- Takahashi R., Sekine N., Nakatake T. (1999). Influence of monoclonal antiplatelet glycoprotein antibodies on in vitro human megakaryocyte colony formation and proplatelet formation. *Blood*. 93(6):1951-8.
- Tamaoki T., Nomoto H., Takahashi J. I., Kate Y., Morimoto M., Tomita F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>dependiente protein kinase. *Biochem and Biophys Res Commun*. 135:397-402.
- Tomer Aaron. (2004.) Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood*. 104(9):2722-7.
- Tsiftoglou AS., Pappas IS., Vizirianakis IS. (2003). Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther*. 100:257-90. Review
- Uzan G., Prenant M., Prandini MH., Martin F., Marguerie G. (1991). Tissue-specific expression of the platelet GPIIb gene. *J Biol Chem*. 266(14):8932-9.

- Vanhoorelbeke K., Ulrichts H., Romijn RA., Huizinga EG., Deckmyn H. (2004). The GPIIb/IIIa-thrombin interaction: far from crystal clear. *Trends Mol Med.* 10: 33-9.
- Wang D., Li H., Yuan H., Zheng M., Bai C., Chen L., Pei X. (2005). Humanin delays apoptosis in K562 cells by downregulation of P38 MAP kinase. *Apoptosis.* 10(5):963-71.
- Ward CM., Andrews RK., Smith AL., Berndt MC. (1996). Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein IIb/IIIa. Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein IIb/IIIa as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin. *Biochemistry.* 35:4929-38.
- Ward CM., Kestin AS., Newman PJ. (2000). A Leu262Pro mutation in the integrin  $\beta 3$  subunit results in an  $\alpha IIb-\beta 3$  complex that binds fibrin but not fibrinogen. *Blood.* 96:161-9.
- Ware J., Russell S., Ruggeri ZM. (2000). Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(6):2803-8.
- Weeterings C., Adelmeijer J., Myles T., de Groot PG., Lisman T. (2006). Glycoprotein IIb/IIIa-mediated platelet adhesion and aggregation to immobilized thrombin under conditions of flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(3):670-5.
- Whalen AM., Galasinski SC., Shapiro PS., Nahreini TS., Ahn NG. (1997). Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol.* 17(4):1947-58.
- Wiseman JC., Ma LL., Marr KJ., Jones GJ., Mody CH. (2007). Perforin-dependent cryptococcal microbicidal activity in NK cells requires PI3K-dependent ERK1/2 signaling. *J Immunol.* 178(10):6456-64.
- Woessmann W., Zwanzger D., Borkhardt A. (2004). ERK signaling pathway is differentially involved in erythroid differentiation of K562 cells depending on time and the inducing agent. *Cell Biol Int.* 28(5):403-10.
- Wolf M., Baggiolini M. (1988). The protein kinase inhibitor Staurosporine, like phorbol esters, induces the association of protein kinase C with membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 154:1273-1279.
- Wright PS., Saudek V., Owen TJ., Harbeson SL., Bitonti AJ. (1993). An echistatin C-terminal peptide activates GPIIb/IIIa binding to fibrinogen, fibronectin, vitronectin and collagen type I and type IV. *Biochem J.* 293:263-7.
- Xie J., Pabon D., Jayo A., Butta N., Gonzalez-Manchon C. (2005). Type I Glanzmann thrombasthenia caused by an apparently silent beta3 mutation that results in aberrant splicing and reduced beta3 mRNA. *Thromb Haemost.* 93(5):897-903.

- Yen A., Varvayanis S., Platko JD. (1993). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and staurosporine induce increased retinoblastoma tumor suppressor gene expression with megakaryocytic differentiation of leukemic cells. *Cancer Res.* 53(13):3085-91.
- York RD., Molliver DC., Grewal SS., Stenberg PE., McCleskey EW., Stork PJ. (2000). Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol.* 20(21):8069-83.

***ANEXOS***

## 8. ANEXOS.

## 8.1. Artículo 1.

*Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 2238–2247

## ORIGINAL ARTICLE

## Thrombin induces GPIb-IX-mediated fibrin binding to $\alpha_{IIb}\beta_3$ in a reconstituted Chinese hamster ovary cell model

D. PABÓN, A. JAYO, J. XIE, P. LASTRES and C. GONZÁLEZ-MANCHÓN

Department of Molecular and Cellular Pathophysiology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain

**To cite this article:** Pabón D, Jayo A, Xie J, Lastres P, González-Manchón C. Thrombin induces GPIb-IX-mediated fibrin binding to  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in a reconstituted Chinese hamster ovary cell model. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2238–47.

**Summary.** *Background:* The interaction of thrombin with platelet glycoprotein (GP) Ib-IX-V has been recently suggested to induce fibrin-dependent platelet aggregation associated with signaling events. The approaches used to avoid the protease-activated receptor (PAR) thrombin receptors in platelets have provided controversial conclusions regarding the precise mechanism and molecules involved in the response. *Objectives:* In the present study, we developed a cellular model to investigate the functional consequences following the binding of thrombin to GPIb-IX. *Methods:* We used Chinese hamster ovary (CHO) cells stably expressing human  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and/or GPIb-IX complexes (CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells) to analyze the effect of thrombin on the binding of polymerizing fibrin by using fluorescein isothiocyanate-fibrinogen as precursor. *Results:* Thrombin induces, in a dose-dependent manner, the binding of polymerizing fibrin to CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells. This response is not observed in cells expressing only one of the receptors, and it can be blocked by monoclonal antibodies against  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and GPIb $\alpha$ . We show that the reaction is not due to simple cell trapping by the fibrin clot, and provide data supporting a role of a signaling pathway in which the 14-3-3 $\zeta$  adaptor and calcium-calmodulin-dependent events are involved. *Conclusions:* The present data support a significant role of GPIb-IX and  $\alpha_{IIb}\beta_3$  receptors in an alternative fibrin-mediated pathway of platelet activation induced by thrombin.

**Keywords:**  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , Chinese hamster ovary cells, fibrin, GPIb-IX, thrombin.

### Introduction

The platelet glycoprotein (GP) Ib-IX-V complex plays an essential role in primary hemostasis, regulating the early adhesion of platelets to exposed subendothelium through the

binding to von Willebrand factor (VWF). The complex comprises four transmembrane subunits: GPIb $\alpha$  covalently linked to GPIb $\beta$ , GPIX and GPV, in a final stoichiometry of 2:2:2:1. GPIb $\alpha$  functions also as a high-affinity thrombin-binding site facilitating platelet activation at low concentrations of the agonist [1]. Although it has long been recognized that this interaction is required for optimal platelet activation [2], the precise biological significance and the mechanism of GPIb $\alpha$  in thrombin-mediated platelet activation remain unclear. This has been attributed to the presence of the protease-activated receptors (PARs)-1 and -4 that are also involved in the activation of human platelets and are activated by low and high concentrations of thrombin, respectively [3]. In addition, a recent study indicates that GPIb $\alpha$  and adenosine diphosphate (ADP) act in synergy to amplify PAR-1 coupled responses [4].

Recently, several lines of evidences have provided new insights into the activation signals triggered by the interaction of thrombin with GPIb $\alpha$ . The recently reported crystal structure of platelet GPIb $\alpha$  bound to thrombin demonstrates the simultaneous interaction of GPIb $\alpha$  with thrombin exosites I and II, enabling the contact of GPIb $\alpha$  with two distinct thrombin molecules [5,6]. It has been suggested that this interaction would lead to receptor clustering, an event that commonly triggers activation signals.

Furthermore, strategies have been designed in order to study the functional consequences of the thrombin-GPIb $\alpha$  interaction without interference of the much stronger PAR-mediated pathway. By using platelets with desensitized PARs, several authors have reported that thrombin induces GPIb $\alpha$ -dependent aggregation that requires polymerizing fibrin and is associated with signaling events [7,8]. In these reports, data regarding the identity of the platelet receptor involved in the fibrin-dependent aggregation are controversial.

Ramakrishnan *et al.* [9] reported a signaling pathway triggered by the binding of catalytically inactive thrombin to GPIb $\alpha$  in GPV-depleted platelets. This pathway was dependent on ADP secretion and results in activation of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and consequently in aggregation. In agreement with these observations, immobilized proteolytically inactive thrombin has been shown to induce GPIb $\alpha$ -dependent platelet activation in which ADP plays a major role [10]. In this study, activation of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin was also shown to be a consequence of the

Correspondence: Consuelo González-Manchón, Department of Molecular and Cellular Pathophysiology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, 28040-Madrid, Spain.  
Tel.: +34 91 837 3112; fax: +34 91 536 0432; e-mail: cgmanchon@cib.csic.es

Received 12 April 2006, accepted 17 July 2006



GPIIb-thrombin interaction. In these models, in contrast to the results obtained from platelets with desensitized PARs, a fibrin receptor would not be required because inactivated thrombin, unable to form fibrin, was used.

More recently, GPIIb-dependent interaction of platelets with immobilized thrombin has been demonstrated under flow conditions [11]. The reported findings suggest that the thrombin-GPIIb interaction, by inducing receptor crosslinking, may trigger different responses to facilitate platelet activation by low doses of thrombin. However, it cannot be excluded that some of the observed discrepancies came from technical aspects such as incomplete PAR or thrombin inactivation and/or granule secretion of fibrinogen and ADP content. Furthermore, it has been also claimed that the reported fibrin-mediated aggregation is due merely to platelet trapping, which is not dependent on platelet activation or GPIIb [12].

In the present work we have used a cellular model to further investigate whether the binding of thrombin to GPIIb-IX triggers an alternative activation pathway. The results suggest that the thrombin-GPIIb interaction induces signaling events leading to the binding of polymerizing fibrin to a conformational state of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  that is not able to bind fibrinogen.

## Materials and methods

### Antibodies and reagents

Monoclonal antibodies (mAbs) specific for  $\beta_3$  (713H7) and  $\alpha_{IIb}$  (701E5) were raised in our laboratory, using as antigen  $\alpha_{IIb}\beta_3$  heterodimer isolated from human platelets [13]. The mAb 11E5D6, produced in the laboratory, is directed against the antifibrinogen A $\alpha$  chain of fibrinogen. mAbs P37 and M3, anti- $\beta_3$  and anti- $\alpha_{IIb}$ , respectively, were provided by J. González (Institute Rocasolano, CSIC, Madrid, Spain). mAbs SZ2 (anti-GPIIb) and SZ1 (anti-GPIX) were from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), and AK2 (anti-GPIIb) was from Serotec (Oxford, UK). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit antimouse immunoglobulin was purchased from Dako A/S (Glostrup, Denmark). The horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat antimouse was from BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). FITC-PAC-1 was obtained from Becton Dickinson (San José, CA, USA). Antiphosphotyrosine mAb PY99 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), and antiphospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) polyclonal antibody was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

Thrombin from human plasma (2500 NIH U mg<sup>-1</sup> protein), W7 (calmodulin antagonist), genistein (tyrosin protein kinase inhibitor), cytochalasin D (actin polymerization inhibitor), and Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (TRAP-6) and Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptides were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). LY294002 (phosphoinositide 3-kinase inhibitor), PD98059 (MAP kinase inhibitor), Bisindolylmaleimide I (BIM-1, protein kinase C inhibitor) and Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) peptide were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA,

USA). Recombinant hirudin was a gift from Namos GmbH (Bannewitz, Germany), and purified heparin and bismarck (low-molecular-weight heparin, BMP) were provided by Rovi Pharmaceutical Laboratories (Madrid, Spain).

### Chinese hamster ovary cell lines stably expressing $\alpha_{IIb}\beta_3$ and/or wild-type or mutant GPIIb-IX

The generation of Chinese hamster ovary (CHO) cell line stably expressing  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$  cells) has been previously reported [14]. Cell clones expressing  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and GPIIb-IX receptors (CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells) were established by transfection of CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$  cells with the cDNAs encoding GPIIb, GPIIb and GPIX cloned into the pcDNA3 expression plasmid, using the calcium phosphate precipitation procedure. G-418 resistant cells were cloned using a FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson) after labeling the cells with the anti-GPIIb mAb AK2. The sorted clones were further selected for GPIIb and GPIX expression by using the anti-GPIX mAb SZ1, which recognizes the GPIIb-IX complex. Several clones expressing similar levels of recombinant receptors were used for the experiments.

CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX(605) cells were established by transfecting a truncated form of GPIIb lacking the last five residues of the cytoplasmic carboxyterminal domain.

CHO cells expressing the GPIIb-IX complex (CHO-IbIX cells) were kindly provided by J. A. López (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA).

### Analysis of cell surface and total receptor content

Cells were harvested using 0.5 mM EDTA in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended at a density of 10<sup>5</sup> cells per 100  $\mu$ L, and incubated for 30 min at 4 °C with the specific mAb. Cells were then washed and incubated in a 1:25 dilution of FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit antimouse immunoglobulin for 30 min. Cells were either analyzed in a flow cytometer (EPICS XL; Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) or cloned using a cell sorter.

For total receptor cell content estimation, cells were lysed in 50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.05% Tween 20, supplemented with 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) and 5  $\mu$ L 100  $\mu$ L<sup>-1</sup> protease inhibitor cocktail (Sigma) and incubated with biotin-NHS, followed by immunoprecipitation with specific mAbs anti- $\alpha_{IIb}$  or anti-GPIIb, separation in 6–16% SDS-PAGE and blotting with avidin-HRP (BioRad Laboratories).

### FITC-labeling of fibrinogen and fibrin polymerization assay

Plasminogen-depleted fibrinogen from human plasma (Calbiochem, containing  $\geq 95\%$  clottable proteins) was labeled with FITC. Briefly, fibrinogen was diluted to 2 mg mL<sup>-1</sup> in PBS and the pH adjusted to 9.0 with 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The solution was incubated with 1 mg mL<sup>-1</sup> FITC on celite 10% (Calbiochem) at room temperature (RT) with intermittent vortexing. The

2240 D. Pabón et al

celite was separated by centrifugation and unreacted free FITC was cleaned by passing the reaction mix through a Sephadex G-25 column equilibrated with PBS pH 7.4. The molar ratio of fluorescein to protein varied from 7 to 9, and the concentration of FITC-fibrinogen determined by measuring absorbance at 280 and 495 nm was around 1 mg mL<sup>-1</sup>. FITC-fibrinogen (6–8 mg mL<sup>-1</sup>) was obtained by concentrating the labeling reactions with Centrprep columns (Millipore, Bedford, MA, USA) before FITC cleaning. Aliquots of FITC-fibrinogen were stored at -80 °C and quickly thawed to RT before use.

For fibrin polymerization assays, fibrinogen or FITC-fibrinogen (200 µg mL<sup>-1</sup>) were incubated with different concentrations of thrombin in a final volume of 50 µL of Tyrode buffer (5 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, 134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4) containing 2 mM calcium for 30 min at RT. The reactions were stopped by adding a volume of 2 × Laemmli buffer (125 mM Tris-Cl, pH 6.8, 8% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 17% glycerol) and 25 µL samples were electrophoresed on 10% SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and stained with amidoblack.

#### Fibrin and PAC-1 binding assays

CHO cell lines growing in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum were harvested with 0.5 mM EDTA and resuspended in Tyrode buffer containing 2 mM CaCl<sub>2</sub>, at a density of 0.25–0.5 × 10<sup>6</sup> cells 100 µL<sup>-1</sup> and incubated in the absence or presence of different concentrations of thrombin for 5 min at RT. FITC-fibrinogen (160–1600 µg mL<sup>-1</sup>) or FITC-PAC-1 (12.5 µg mL<sup>-1</sup>) was then added and, after 20–30 min at RT, cells were washed by centrifugation and analyzed by flow cytometry. Before data acquisition, macroscopic fibrin clots were removed from the samples. In order to analyze only single cells, events were gated based on their forward- vs. side-scatter properties, discarding aggregates of cells trapped in microscopic fibrin meshes. When indicated, cells were preincubated with different reagents before thrombin addition.

In some experiments, fibrin polymerization was analyzed by transferring 20 µL aliquot of the reaction to a volume of 2 × Laemmli buffer. Samples were resolved on 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes that were either analyzed by Western blot with a mAb anti- $\alpha$ -fibrinogen or stained with amidoblack.

#### Phosphotyrosine and p44/42 MAPK immunoblot analysis

To determine the pattern of total protein tyrosine phosphorylation, cells were diluted at a density of 0.5–1 × 10<sup>6</sup> cells 50 µL<sup>-1</sup> and then stimulated with thrombin at RT for different periods of time. After adding a volume of 2 × Laemmli buffer to stop thrombin stimulation, a portion of the cell lysate was separated by 6–16% SDS-PAGE under reduced conditions, transferred to PVDF sheets and immunoblotted with the antiphosphotyrosine mAb PY99. After incubation with HRP-conjugated antimouse immunoglobulin G (IgG),

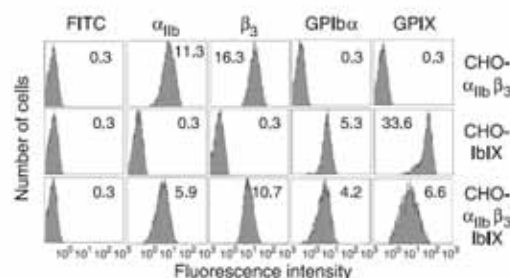
the bound antibody was visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL) system. Alternatively, 3–4 × 10<sup>6</sup> cells were lysed in 300 µL of ice-cold Nonidet P-40 buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 137 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol) supplemented with 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 5 µL 100 µL<sup>-1</sup> protease inhibitor cocktail, precleared and incubated with 30 µL of agarose-conjugated antiphosphotyrosine mAb 4G10 for 4 h at 4 °C. The immunoprecipitates were then electrophoresed and blotted with antiphosphotyrosine mAb PY99 as described.

Phosphorylation of p44/42 MAPK subunits by thrombin stimulation of 250,000 cells preincubated or not with 5 µg mL<sup>-1</sup> SZ2 mAb or 40 µM TRAP-1 was determined by Western analysis. Cell lysates were electrophoresed and blotted with an antiphospho-p44/42 MAPK polyclonal antibody.

## Results

#### Establishment of $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX CHO cell lines

CHO cell lines stably expressing  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and GPIb-IX complexes were generated by transfecting cDNAs encoding the amino acid sequence for GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  and GPIX into cells stably expressing  $\alpha_{IIb}$  and  $\beta_3$  (CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$  cells). Among the stable transfectants, cell lines expressing levels of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin and GPIb $\alpha$  comparable to CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$  and CHO-IbIX cells, respectively, were selected. The surface receptor expression was estimated by flow cytometry (Fig. 1) and the total cell content by immunoprecipitation analysis of biotin-labeled total cell lysates (data not shown). GPIb $\beta$ IX dimer expression is higher in CHO-IbIX cells, as detected by the anti-GPIX mAb SZ1, which recognizes an epitope requiring the GPIX subunit to be complexed to GPIb $\beta$ . However, the fluorescence detected by the anti-GPIb $\alpha$  mAb directly correlates with the amount of total complex, because GPIb $\alpha$  can not be efficiently expressed at the cell surface in the absence of the other subunits (Fig. 1).



**Fig. 1.** Surface expression of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and glycoprotein (GP) Ib-IX complexes in stably transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells. CHO cell lines stably expressing the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and/or GPIb-IX complexes were established as described in Materials and methods. Surface receptor expression was determined by flow cytometry using mAbs directed against  $\alpha_{IIb}$  (701E5),  $\beta_3$  (713H7), GPIb $\alpha$  (AK2) and GPIX (SZ1). Numbers in the figure panels represent the values of the mean fluorescence levels in arbitrary units.

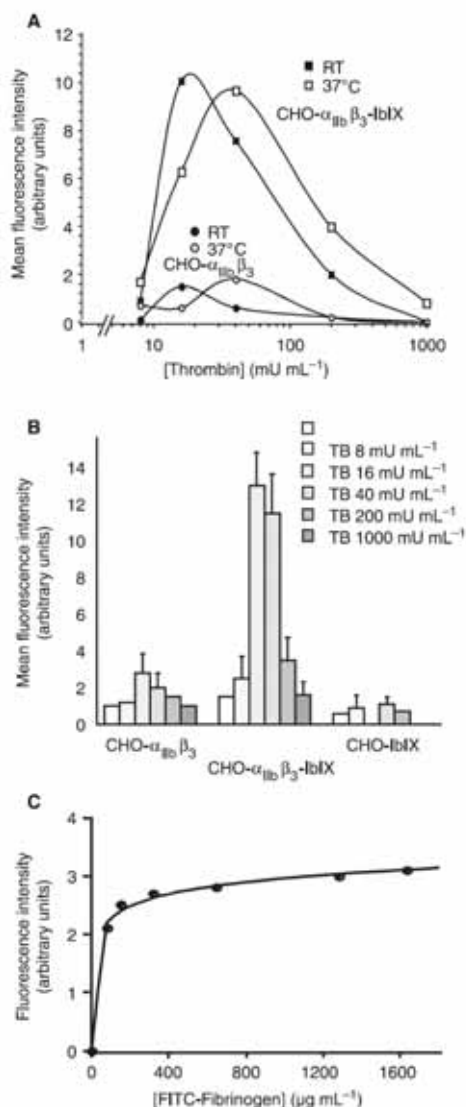
### Thrombin induces the binding of fibrin to CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells

Figure 2A shows that thrombin induces, in a dose-dependent manner, an increase in surface fluorescence in CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells incubated in the presence of FITC-fibrinogen. The maximal effect was normally achieved with concentration ranging from 10 to 40  $\mu\text{M mL}^{-1}$ ; however, in some instances, lower concentrations were also effective. Higher thrombin concentrations increase the rate of clot formation and reduce the fluorescence signal reaching basal levels at a concentration close to 1  $\text{U mL}^{-1}$ . No significant differences were obtained whether the assays were carried out at 37 °C or at RT. This effect of thrombin was much less apparent in cells expressing only the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin or the GPIb-IX complex, suggesting that both receptors are needed (Fig. 2B). As shown in Fig. 2C, increasing FITC-fibrinogen concentration in a range of 160–1600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  did not significantly modify the effect of 40  $\mu\text{M mL}^{-1}$  thrombin on cell binding.

To confirm that both receptors are involved in the binding response induced by thrombin, cells were preincubated with mAbs directed against  $\alpha_{IIb}\beta_3$  or GPIb-IX. The anti- $\beta_3$  mAb, P37, which recognizes an epitope located in the 150–216 segment of the 23-kDa N-terminal fragment of  $\beta_3$ , has been shown to inhibit platelet aggregation [14]. As shown in Fig. 3, P37 inhibits the binding effect in a dose-dependent manner. In contrast, M3, an anti- $\alpha_{IIb}$  mAb without effect on platelet aggregation [15], did not block the effect of thrombin (results not shown). Furthermore, the anti-GPIb mAb, SZ2, which recognizes the sulfated-tyrosine-containing sequence involved in the thrombin binding [16], was also found to block the binding effect induced by thrombin (Fig. 3). Fibrin polymerization, assessed by clot formation and detection of soluble fibrin by SDS-PAGE, was not altered by the presence of any of these antibodies (data not shown).

In PAR-desensitized platelets, thrombin-triggered signaling does not induce the conformational changes of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  needed to bind fibrinogen [8]. We explored this possibility by using the mAb PAC-1, which recognizes an epitope of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin in activated platelets. As shown in Fig. 4A, thrombin stimulation does not affect the binding of FITC-PAC-1 to CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells, suggesting that  $\alpha_{IIb}\beta_3$  is not present in a conformation able to bind fibrinogen.

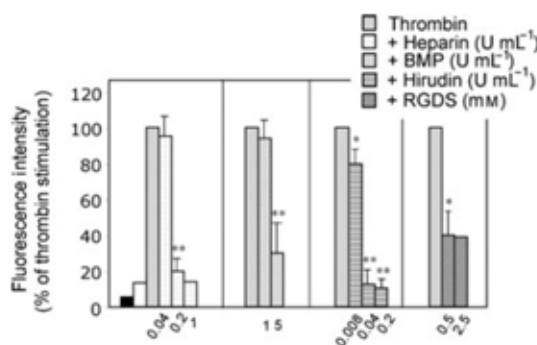
In our experimental conditions, a fibrin clot becomes macroscopically detectable at thrombin ranging between 16 and 40  $\text{mU mL}^{-1}$ , the same concentrations that produced maximal binding effects. Fibrin has been suggested to be involved in platelet aggregation induced by the GPIb-thrombin interaction [7,8]. As shown in Fig. 4B, in the presence of the GPRP peptide, which inhibits fibrin polymerization, the binding effect of low concentrations of thrombin was completely impeded. Furthermore, altering the order of addition of the cells produces a significant change in the extent of the response. When fibrinogen is added to cells that have been first incubated with thrombin, a maximal effect is obtained. However, a significantly reduced binding is observed when



**Fig. 2.** Flow cytometry analysis of cell binding induced by thrombin in the presence of fluorescein isothiocyanate (FITC)-fibrinogen. (A) Chinese hamster ovary (CHO) cells stably expressing  $\alpha_{IIb}\beta_3$  or both  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and glycoprotein Ib-IX complexes were stimulated with increasing concentrations of thrombin for 5 min. Then, FITC-fibrinogen (160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was added and incubation continued for 30 min either at room temperature or at 37 °C. After washing, cell binding was determined by flow cytometry. (B) The bar graph shows the values of mean fluorescence intensity upon addition of 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  FITC-fibrinogen to CHO cell lines stimulated with increasing thrombin concentrations. Data represent the means  $\pm$  SD of at least four experiments. (C) Effect of increasing FITC-fibrinogen concentration on cell binding induced by thrombin (40  $\text{mU mL}^{-1}$ ). The non-specific basal binding of fibrinogen was determined in each condition and the values subtracted from those obtained in the presence of thrombin. Data are representative of three independent determinations.







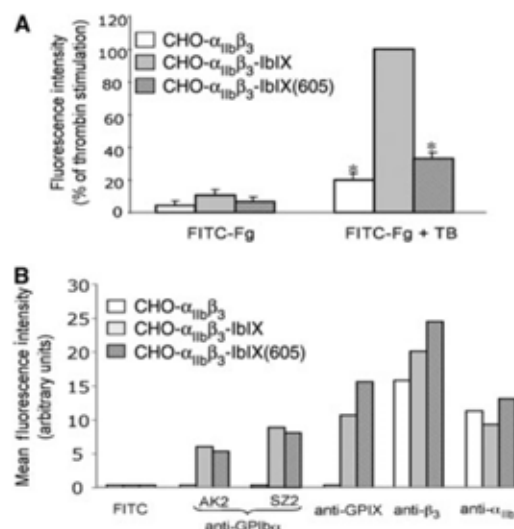
**Fig. 5.** Effect of heparins, hirudin and RGDS on thrombin-induced fibrin binding to Chinese hamster ovary (CHO)- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells. Cells were stimulated with thrombin ( $16 \text{ mU mL}^{-1}$ ) for 5 min in the absence or presence of the indicated concentrations of high- or low-molecular-weight heparins. Hirudin and RGDS peptide were added to cells preincubated with thrombin for 2–5 min. Then, fluorescein isothiocyanate-fibrinogen (FITC-fibrinogen) ( $160 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was added and incubation continued for 30 min. The black filled bar represents cells incubated in the absence of FITC-fibrinogen, and the unfilled bar represents cells non-stimulated by thrombin. Data are means  $\pm$  SD of at least three independent determinations and are expressed as percentage of the thrombin effect. Statistical significance: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

$16 \text{ mU mL}^{-1}$  thrombin was completely blocked by  $40 \text{ mU mL}^{-1}$  of the direct thrombin inhibitor, hirudin (Fig. 5). By analyzing fibrin formation by SDS-PAGE, we found that this effect of hirudin is directly related to its capacity to inhibit the conversion of fibrinogen to fibrin. In contrast, high- and low-molecular-weight heparins were able to block the effect of thrombin (Fig. 5) in conditions in which clot fibrin formation was not impeded (data not shown).

$\alpha_{IIb}\beta_3$  can recognize fibrinogen and fibrin through the RGDS sequence. As shown in Fig. 5, the tetrapeptide RGDS blocked the thrombin-induced effect of binding, supporting the involvement of the transfected  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin.

#### Signaling events associated with the interaction of thrombin and CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells

The intracellular domains of the GPIb subunits contain binding sites for the signal transduction protein 14-3-3 $\zeta$  [17]. As this interaction has been implicated in functional events mediated by signaling through the GPIb-IX complex [18–21], we considered of interest to analyze whether 14-3-3 $\zeta$  is involved in the GPIb-IX-mediated thrombin response. We generated CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX(605) cells expressing  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and GPIb-IX containing a 5-residue cytoplasmic tail truncated form of GPIb $\alpha$ . Using a yeast two-hybrid system we determined that, in contrast to the wild type, the mutated GPIb $\alpha$  cytoplasmic domain does not directly interact with 14-3-3 $\zeta$  (data not shown). As shown in Fig. 6, CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX(605) cells, expressing amounts of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and GPIb-IX similar to control cells, showed a significantly reduced binding response to thrombin.

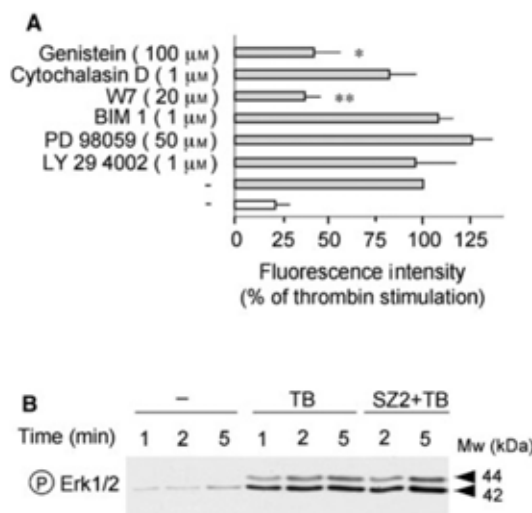


**Fig. 6.** Truncation of the cytoplasmic tail of glycoprotein (GP) Ib $\alpha$  blocks the cell binding induced by thrombin. (A) Flow cytometry analysis of cell binding induced by thrombin. Chinese hamster ovary (CHO) cell transfectants were stimulated with  $40 \text{ mU mL}^{-1}$  thrombin for 5 min and then fluorescein isothiocyanate-fibrinogen ( $160 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was added and incubation continued for 30 min. After washing, cell binding was determined by flow cytometry. The values of fluorescence are calculated as a product of the percent of gated positive cells and the value of the mean channel of fluorescence intensity, and expressed as percentage of the thrombin effect in CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells. Results are means  $\pm$  SD of three experiments (\* $P < 0.01$ ). (B) Surface expression of GPIb-IX and  $\alpha_{IIb}\beta_3$  complexes in CHO stable transfectants used in the experiments shown above. The expressions of GPIb $\alpha$ , GPIX,  $\beta_3$  and  $\alpha_{IIb}$  were analyzed by flow cytometry using specific monoclonal antibodies, as described in Materials and methods.

To gain some more insight into the biochemical mechanism triggered by the thrombin-GPIb-IX interaction we analyzed intracellular signaling pathways involved in GPIb-IX-mediated responses, by treating cells with specific inhibitors prior to thrombin stimulation (Fig. 7A). Although the pattern of total protein tyrosine phosphorylation was not changed by thrombin (results not shown), we found a significant reduction of thrombin-induced binding upon incubation of cells with the tyrosine phosphorylation inhibitor genistein. In addition, the inhibitory effect of the calmodulin antagonist W7 suggests that a calcium-calmodulin dependent pathway is involved in the response to thrombin.

It has been suggested that Erk1/2 phosphorylation participates in the signaling events triggered by the thrombin-GPIb $\alpha$  interaction in platelets [8]. As shown in Fig. 7B, we detected increased Erk1/2 phosphorylation upon thrombin stimulation. However, GPIb-IX might not be involved, because the response was not blocked by the mAb SZ2 and was also detected in cells lacking the GPIb-IX complex (data not shown). According to that, the selective inhibitor of MEK-1 PD98059 did not prevent the effect of thrombin on cell binding (Fig. 7A). Moreover, data from Fig. 8A suggest that Erk1/2

2244 D. Pabón et al

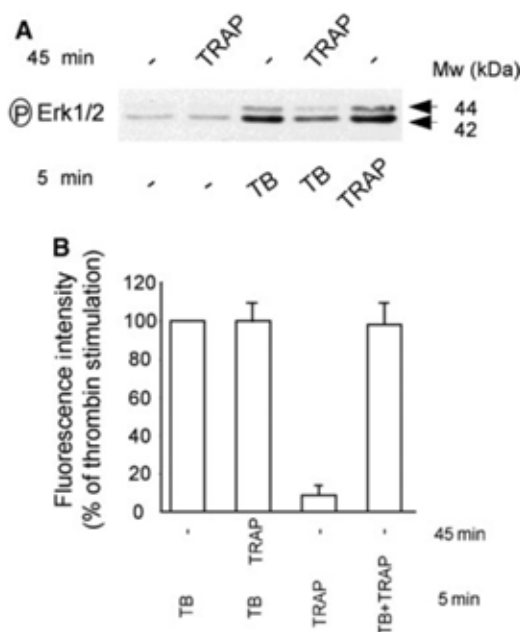


**Fig. 7.** A calcium/calmodulin but not MAPK-dependent pathway is involved in the response of Chinese hamster ovary- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells to thrombin. (A) Effect of different inhibitors on thrombin-induced cell binding. Cells were preincubated for 30 min at 37 °C in the absence or presence of the inhibitors, stimulated with 16  $\mu$ M thrombin for 5 min and then fluorescein isothiocyanate-fibrinogen (FITC-fibrinogen) (160  $\mu$ g  $\text{mL}^{-1}$ ) was added and incubation continued for 30 min at room temperature. The unfilled bar represents cells incubated with FITC-fibrinogen in the absence of thrombin. The values of fluorescence are calculated as products of the percent of gated positive cells and the value of the mean channel of fluorescence intensity, and expressed as percentage of the thrombin effect. Results are means  $\pm$  SD of three experiments. (B) Phosphorylation of p44/42 MAPK by thrombin is not impeded by the anti-GPIIb/IIIa monoclonal antibody, SZ2. Cells were preincubated with SZ2 (5  $\mu$ g  $\text{mL}^{-1}$ ) for 30 min and then stimulated with 40  $\mu$ M thrombin for the indicated times. Cell lysates were analyzed on 10% SDS-PAGE as described in Materials and methods. Statistical significance: \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01.

phosphorylation induced by thrombin is mediated by endogenous PAR-1, as the response was significantly decreased in cells desensitized with the PAR-1 agonist hexapeptide TRAP. However, as represented in Fig. 8B, the extent of cell binding was similar in cells untreated and pretreated with TRAP, suggesting that endogenous PAR-1 is not involved in the binding response induced by thrombin.

## Discussion

Recently, several studies using different experimental models have provided new insights on the thrombin receptor function of GPIIb/IIIa. These models were designed in order to differentiate between the GPIIb-mediated and PARs-mediated thrombin responses. By using catalytically inactive thrombin [9,10] or by desensitizing the PARs [7,8], these studies demonstrate that the interaction of thrombin with the GPIIb-IX complex can induce platelet aggregation associated with signaling events. However, the results are controversial regarding the precise mechanism and molecules involved in the response. It is possible that



**Fig. 8.** Endogenous PARs do not participate in Chinese hamster ovary- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cell binding induced by thrombin. (A) Phosphorylation of p44/42 MAPK by thrombin is blocked by preincubation with the activator hexapeptide TRAP-1. Cells were preincubated in the absence or presence of 40  $\mu$ M TRAP-1 for 45 min at room temperature and then stimulated with 40  $\mu$ M thrombin for 5 min. Cell lysates were analyzed on 10% SDS-PAGE as described in Methods. (B) Flow cytometry analysis of fibrin binding induced by thrombin. Cells were preincubated with TRAP-1, as above, and then stimulated with thrombin  $\pm$  TRAP for 5 min. Fluorescein isothiocyanate-fibrinogen (160  $\mu$ g  $\text{mL}^{-1}$ ) was added and incubation continued for 30 min. After washing, cell binding was determined by flow cytometry. The values of fluorescence are calculated as a product of the percent of gated positive cells and the value of the mean channel of fluorescence intensity, and expressed as percentage of the thrombin effect. The non-specific basal binding of fibrinogen was determined in each condition and the values subtracted from those obtained in the presence of thrombin. Results are means  $\pm$  SD of three experiments.

technical aspects of platelet experiments may account for some of the reported discrepancies.

In the present work, a cellular model was used to characterize the functional consequences of the thrombin-GPIIb/IIIa interaction without the interference of the stronger PAR-mediated response and the difficulties inherent to platelet manipulation. Basically, we have analyzed the effect of increasing concentrations of thrombin on binding of FITC-fibrinogen to CHO cells stably expressing the human platelet GPIIb-IX and/or  $\alpha_{IIb}\beta_3$  complexes. Using different blocking agents and specific inhibitors, we obtained data suggesting an operative pathway triggered by the interaction of thrombin with GPIIb-IX that leads to the binding of fibrin to  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin. The extent of the thrombin response was not significantly affected by the amount of fibrinogen in a wide range of concentrations. The involvement of both GPIIb-IX

and  $\alpha_{IIb}\beta_3$  receptors is supported by the small or undetectable binding effect obtained in cells expressing  $\alpha_{IIb}\beta_3$  or GPIb-IX complexes, respectively. Moreover, an anti-GPIb $\alpha$  mAb that blocks thrombin binding to its high affinity site in GPIb $\alpha$  was found to prevent the effect of thrombin on CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -GPIbIX cells, supporting the role of the thrombin-GPIbIX interaction in this process.

CHO cells expressing  $\alpha_{IIb}\beta_3$  do not bind soluble fibrinogen but they can be forced to do so if the fibrinogen receptor is activated through ligand stimulation of over-expressed physiological agonist receptors [22,23]. In these cells, enhanced binding of the activation-dependent IgM PAC-1 was also achieved upon agonist stimulation. In contrast, in the present study the undetectable binding of PAC-1 to CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells suggests that thrombin binding to GPIb-IX is not sufficient to induce the conformational changes that enable  $\alpha_{IIb}\beta_3$  to bind fibrinogen. The following data support that is polymerizing fibrin what is bound to CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells. First, inhibition of fibrin polymerization by either the GPRP peptide or the thrombin inhibitor hirudin completely blocked the thrombin-induced cell binding. Second, in our experimental conditions, cell binding is detected at thrombin concentrations that produce a slow conversion of fibrinogen to fibrin, allowing the detection of soluble species of fibrin by SDS-PAGE analysis. Thrombin doses greater than 200 mU mL<sup>-1</sup> induce the rapid formation of an insoluble fibrin clot associated with decreased cell binding. Finally, significant differences in cell binding are obtained depending on the order of addition of the reaction components. When cells are added after a lag period in which the thrombin generation of fibrin is in progress, the observed effect is markedly reduced. It is also possible that the antithrombin I activity of fibrin contributed to this reduction [24].

The reported fibrin-dependent aggregation has been attributed to the fact that platelets become trapped during the conversion of fibrinogen to fibrin [12]. A non-specific cell trapping by the fibrin network was observed at the higher concentrations of thrombin used in our experimental conditions. However, by using both flow cytometry and fluorescence microscopy analysis, we demonstrated that binding of polymerizing fibrin to individual cells was specific to the CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX line.

It has been also pointed out that thrombin may act by facilitating the formation of a fibrin-thrombin-GPIb $\alpha$  ternary complex. Such mechanism could operate *in vivo*, serving as the core for further interactions required for clot stabilization [25]. In our experimental model, we did not obtain evidence of the formation of a GPIb-thrombin-fibrin complex, because cells expressing only the GPIb-IX complex do not bind fibrin in response to the agonist.

Two studies have previously shown that thrombin-GPIb-IX interaction induces fibrin-dependent platelet aggregation. However, they disagree with respect to the identity of the fibrin receptor [7,8]. In our experimental conditions, the small but significant effect of low concentrations of thrombin on CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$  cells could be attributed to binding of fibrin to

resting  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . p37, an anti- $\beta_3$  mAb that has been shown to block platelet aggregation by thrombin was found to prevent the effect of thrombin on both CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$  and CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells. Together with the inhibition by the RGDS peptide, the results suggest that the binding of polymerizing fibrin is mediated by the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin. Some of the fibrinogen recognition sites for integrins become exposed upon its conversion into fibrin [26–28]. Also, although widely accepted, it has not been proved that polymerizing fibrin and fibrinogen both bind to  $\alpha_{IIb}\beta_3$  through the same peptide sites during platelet aggregation [29,30]. In the present work,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin expressed in CHO cells can bind polymerizing fibrin but not fibrinogen following thrombin-GPIbIX interaction, supporting a unique role for fibrin in mediating an alternative platelet aggregation triggered by the thrombin-GPIb interaction. Further studies may clarify whether fibrin is bound to resting  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin, as suggested in the studies with platelets [8], or to a partially activated receptor.

Our data also provide evidence of signaling events coupled to the fibrin binding induced by thrombin. The pattern of total protein tyrosine phosphorylation displayed by unstimulated CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells was not altered by thrombin in either the absence or the presence of genistein, a tyrosine-specific protein kinase inhibitor. However, a significant reduction of thrombin-induced cell binding was obtained in the presence of the inhibitor, suggesting that tyrosine phosphorylation-dependent signaling events are involved in the response to thrombin. On the other hand, the marked inhibition produced by the calmodulin antagonist W7 may indicate the participation of calcium-calmodulin-dependent kinases. Our observation agrees with data reported by Soslau *et al.* [7] showing that thrombin-GPIb interaction is accompanied by mobilization of internal calcium in PAR-1-desensitized platelets. However, these results have been argued in a more recent study using platelets desensitized for both PAR-1 and PAR-4 [8].

As reported for other GPIb-dependent responses [31], the Erk-MAPK pathway has been shown to participate in the signal cascade triggered by the binding of thrombin to GPIb in platelets [8]. However, our results suggest that phosphorylation of Erk1/2 is not an essential requirement for the GPIb-mediated response to thrombin. Constitutive expression of PAR-1 has been reported in CHO cells [32]. Although in our cellular model thrombin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation is largely mediated by endogenous PAR-1, occupancy of constitutive PAR-1 does not seem to cooperate with GPIb-IX to induce CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cell binding.

The present results with cells expressing a mutant GPIb $\alpha$  with truncation at residue 605 suggest a role for 14–3-3 $\zeta$  protein in regulating the thrombin-induced cell binding to fibrin. This phosphorylation-dependent signaling molecule has been implicated in a number of platelet and megakaryocyte responses mediated by GPIb [18,20]. Although 14–3-3 $\zeta$  also recognizes a site in the cytoplasmic domain of GPIb $\beta$ , our results agree with previous data suggesting that GPIb $\beta$  alone is not sufficient to support high-affinity binding of 14–3-3 $\zeta$ . The SZ2 mAb

recognizes the sulfated-tyrosine-containing sequence of GPIIb $\alpha$  involved in the binding of thrombin and has been shown to prevent the effect of thrombin on cells transfected with wild-type GPIIb $\alpha$ . Binding of SZ2 was similar in both wild and mutant cell types, suggesting that no important structural perturbations have been propagated to the extracellular domain in the GPIIb-IX(605) mutant. However, it remains to be determined whether the GPIIbIX-14-3-3 $\zeta$  interaction is regulating signaling events or modulating the thrombin-binding function of GPIIb-IX as described for the GPIIb $\alpha$ -VWF interaction [21].

Although a number of biochemical, functional and structural data demonstrate the participation of thrombin exosites I and II, the precise nature of the GPIIb $\alpha$ -thrombin interactions remains controversial [33]. Furthermore, it is unclear whether the negatively charged region of GPIIb $\alpha$  containing sulfated tyrosine residues plays a role in the interaction with both anion-binding exosites of thrombin [5,6]. The involvement of thrombin exosites was addressed by analyzing the ability of hirudin and heparin to inhibit the effect of thrombin on the binding of fibrin to CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -IbIX cells. We can not be conclusive about the participation of exosite I, because in our experimental conditions the blocking effect of hirudin could be accounted for by the prevention of fibrin polymerization. In contrast, heparin was found to inhibit the effect of thrombin on cell binding in the presence of polymerizing fibrin, supporting that exosite II is involved in the GPIIb $\alpha$  occupancy by thrombin.

Despite the fact that less than 5% of the approximately 25 000 copies of GPIIb $\alpha$  expressed at the platelet surface has been shown to function as high-affinity thrombin-binding sites, some evidence suggests that the platelet GPIIb-IX receptor might play an important role at the start of the hemostatic process, when trace amounts of thrombin are generated [34]. In this context, the thrombin-GPIIb-IX interaction-dependent pathway may be the first to operate in the presence of low thrombin concentrations [35]. Based on our experimental observations with a cell model, it is not unreasonable to suggest that the proposed GPIIb-dependent platelet aggregation mediated by fibrin may represent a basal hemostatic balance mechanism operating at thrombin concentrations that keep a rate of fibrin polymerization low enough to permit the binding of polymerizing fibrin to platelets. Thus, the consequences of the thrombin-GPIIb-IX interaction may be influenced *in vivo* by factors such as quantitative and/or qualitative changes of thrombin and fibrinogen that could alter fibrin polymerization rate. Additional experiments with selected conditions closer to the physiological situation would provide further insights on the role of GPIIb-IX in platelet activation by thrombin.

In summary, the present work supports previous reports suggesting a novel role for fibrin in an alternative platelet aggregation pathway, secondary to the thrombin-GPIIbIX interaction. Our results provide evidence of the binding of polymerizing fibrin to a conformational state of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin unable to bind soluble fibrinogen. While more studies

are required to assess the potential pathophysiological implications of this pathway, our cellular model provides a useful experimental approach to further investigate the responses triggered by the thrombin-GPIIb-IX interaction.

### Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (BMC2003-01409). J. Xie and A. Jayo are recipients of fellowships from the Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI, Ref. 2002CN0004) and Ministerio de Educación y Ciencia, respectively.

### Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

### References

- Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost* 1995; **21**: 130-6.
- Berndt MC, Gregory C, Dowden G, Castaldi PA. Thrombin interactions with platelet membrane proteins. *Ann NY Acad Sci* 1986; **485**: 374-86.
- Coughlin SR. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 298-307.
- Adam F, Verbeuren TJ, Fauchere JL, Guillin MC, Jandrot-Perrus M. Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 798-804.
- Celikel R, McClintock RA, Roberts JR, Mendolicchio GL, Ware J, Varughese KI, Ruggeri ZM. Modulation of  $\alpha$ -thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ib $\alpha$ . *Science* 2003; **301**: 218-21.
- Dumas JJ, Kumar R, Seehra J, Somers WS, Mosyak L. Crystal structure of the GPIIb $\alpha$ -thrombin complex essential for platelet aggregation. *Science* 2003; **301**: 222-6.
- Soslau G, Class R, Morgan DA, Foster C, Lord ST, Marchese P, Ruggeri ZM. Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 2001; **276**: 21173-83.
- Dubois C, Steiner B, Kieffer N, Meyer Reigner SC. Thrombin binding to GPIIb $\alpha$  induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting  $\alpha_{IIb}\beta_3$  interaction with polymerized fibrin. *Thromb Haemost* 2003; **89**: 853-65.
- Ramakrishnan V, DeGuzman F, Bao M, Hall SW, Leung LL, Phillips DR. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glucoprotein V. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 1823-8.
- Adam F, Guillin MC, Jandrot-Perrus M. Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 2959-70.
- Weeterings C, Adelmeijer J, Myles T, de Groot PG, Lisman T. Glycoprotein Ib $\alpha$ -mediated platelet adhesion and aggregation to immobilized thrombin under conditions of flow. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2006; **26**: 670-5.
- Jarvis GE, Atkinson BT, Frampton J, Watson SP. Thrombin-induced conversion of fibrinogen to fibrin results in rapid platelet trapping which is not dependent on platelet activation or GPIIb. *Br J Pharmacol* 2003; **138**: 574-83.
- González-Manchón C, Arias-Salgado EG, Butta N, Martín G, Rodríguez RB, Elalamy I, Parrilla R, Favier R. A novel homozygous splice mutation in GPIIb associated with alternative splicing, nonsense-



- mediated decay of GPIIb-mRNA, and type II Glanzmann's thrombasthenia. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1071–8.
- 14 Ferrer M, Ayuso MS, Butta N, Parrilla R, González-Manchón C. Role of the  $\alpha$ -subunit 326GRV sequence in the surface expression of fibrinogen and vitronectin receptors. *Am J Physiol* 1998; **275**: 1239–46.
  - 15 Calzada MJ, Alvarez MV, González-Rodríguez J. Agonist-specific structural rearrangements of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Confirmation of the bent conformation in platelets at rest and after activation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 39899–908.
  - 16 Ward CM, Andrews RK, Smith AI, Berndt MC. Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein Iba1. Identification of the sulfated tyrosine/ionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein Iba1 as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin. *Biochemistry* 1996; **35**: 4929–38.
  - 17 Calverley DC, Terrance JK, Roth GJ. Human signaling protein 14–3–3 $\zeta$  interacts with platelet glycoprotein Ib subunits Ib $\alpha$  and Ib $\beta$ . *Blood* 1998; **91**: 1295–303.
  - 18 Feng S, Christodoulides N, Kroll MH. The glycoprotein Ib/IX complex regulates cell proliferation. *Blood* 1999; **93**: 4256–63.
  - 19 Bialkowska K, Zaffran Y, Meyer SC, Fox JEB. 14–3–3 $\zeta$  mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. *J Biol Chem* 2003; **278**: 33342–50.
  - 20 Kanaji T, Russell S, Cunningham J, Izuha K, Fox JE, Ware J. Megakaryocyte proliferation and ploidy regulated by the cytoplasmic tail of glycoprotein Iba1. *Blood* 2004; **104**: 3161–8.
  - 21 Dai K, Bodnar R, Berndt MC, Du X. A critical role for 14–3–3 $\zeta$  protein in regulating the vWF binding function of platelet glycoprotein Ib-IX and its therapeutic implications. *Blood* 2005; **106**: 1975–81.
  - 22 Larrucea S, González-Manchón C, Butta N, Arias-Salgado EG, Shen L, Ayuso MS, Parrilla R. Agonist-induced aggregation of Chinese hamster ovary cells coexpressing the human receptors for fibrinogen (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) and the platelet-activating factor: dissociation between adhesion and aggregation. *Blood* 2002; **99**: 2819–27.
  - 23 Butta N, Larrucea S, González-Manchón C, Alonso S, Parrilla R.  $\alpha$ -Adrenergic-mediated activation of human reconstituted fibrinogen receptor (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) in Chinese hamster ovary cells. *Thromb Haemost* 2004; **92**: 1368–76.
  - 24 Mosesson MW, Antithrombin I. Inhibition of thrombin generation in plasma by fibrin formation. *Thromb Haemost* 2003; **89**: 9–12.
  - 25 Soslaw G, Favero M. The GPIIb-thrombin pathway: evidence for a novel role of fibrin in platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2003; **2**: 522–4.
  - 26 Katagiri Y, Hiroshima T, Akamatsu N, Suzuki H, Yamazaki H, Tanoue K. Involvement of  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin in mediating fibrin gel retraction. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1785–90.
  - 27 Flick MJ, Du X, Degen JL. Fibrin(ogen)- $\alpha$ M $\beta$ 2 interactions regulate leukocyte function and innate immunity in vivo. *Exp Biol Med* 2004; **229**: 1105–10.
  - 28 Cho J, Degen JL, Collier BS, Mosher DF. Fibrin but not fibrinogen supports fibronectin assembly by spread platelets. Effects of the interaction of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 with the C terminus of the fibrinogen  $\gamma$ -chain. *J Biol Chem* 2005; **280**: 35490–8.
  - 29 Rooney MM, Parise LV, Lord ST. Dissecting clot retraction and platelet aggregation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8553–5.
  - 30 Ward CM, Kestin AS, Newman PJ. A Leu262Pro mutation in the integrin  $\beta$ 3 subunit results in an  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 complex that binds fibrin but not fibrinogen. *Blood* 2000; **96**: 161–9.
  - 31 Li Z, Zhang G, Feil R, Han J, Du X. Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Blood* 2006; **107**: 965–72.
  - 32 Majumdar M, Tarui T, Shi B, Akakuras N, Ruf W, Takada Y. Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin  $\alpha$ 9 $\beta$ 1. *J Biol Chem* 2004; **279**: 37528–34.
  - 33 Vanhoorelbeke K, Ulrichs H, Romijn RA, Huizinga EG, Deckmyn H. The GPIIb/IIIa-thrombin interaction: far from crystal clear. *Trends Mol Med* 2004; **10**: 33–9.
  - 34 Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1504–14.
  - 35 Mazzucato M, DeMarco L, Masotti A, Pradella P, Bahou WF, Ruggeri ZM. Characterization of the initial  $\alpha$ -thrombin interaction with glycoprotein Ib $\alpha$  in relation to platelet activation. *J Biol Chem* 1998; **273**: 1880–7.

## 8.2. Artículo 2.

	<p>Platelets • Research Paper</p> <p><b>Type II Glanzmann thrombasthenia in a compound heterozygote for the <math>\alpha</math>IIb gene. A novel missense mutation in exon 27</b></p>
<p>Asier Jayo Dina Pabón Pedro Lastres Victor Jiménez Consuelo González-Manchón</p>	<p><b>Background and Objectives.</b> Glanzmann thrombasthenia is an autosomal recessive bleeding disorder characterized by a life-long hemorrhagic tendency and absent or severely reduced platelet aggregation in response to agonists, caused by quantitative or qualitative abnormalities in the platelet fibrinogen receptor, integrin <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3. The aim of this study was to identify the molecular genetic defect and determine its functional consequences in a patient with type II Glanzmann thrombasthenia.</p> <p><b>Design and Methods.</b> The expression of platelet <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3 was determined by flow cytometry and western blotting. Mutations were identified by sequencing both cDNA and genomic DNA. Functional characterization was assessed by exontrap and transient transfection analysis.</p> <p><b>Results.</b> Flow cytometry and western blot analysis revealed markedly reduced levels of platelet <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3, which may account for the residual fibrinogen binding detected upon platelet activation. Sequencing of genomic DNA revealed the presence of two mutations in the <math>\alpha</math>IIb gene: a C1750T transition in the last codon of exon 17 changing Arg553 to STOP, and a C2829T transition in exon 27 that changes Pro912 to Leu. Sequence analysis of reversely transcribed <math>\alpha</math>IIb mRNA did not detect cDNA from the C1750T mutant allele, and revealed a significant increase of the physiological splicing out of exon 28 in the cDNA carrying the C2829T mutation. Transient expression of [912Leu]<math>\alpha</math>IIb in CHO-<math>\beta</math>3 cells showed a marked reduction in the rate of surface expression of <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3.</p> <p><b>Interpretation and Conclusions.</b> The results suggest that the thrombasthenic phenotype is the result of reduced availability of <math>\alpha</math>IIb-mRNA, enhanced expression of exon 28-deleted transcripts, and defective processing of [912Leu]<math>\alpha</math>IIb.</p> <p>Key words: <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3, Glanzmann thrombasthenia, splicing mutations, platelets.</p> <p>Haematologica 2006; 91:1352-1359</p> <p>©2006 Ferrata Storti Foundation</p>
<p>From the Department of Molecular and Cellular Pathophysiology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain (AJ, DP, PL, CG-M); Laboratory of Hematology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain (VJ).</p> <p>Correspondence: Consuelo González-Manchón Department of Molecular and Cellular Pathophysiology Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu, 9 28040, Madrid, Spain. E-mail: cgmanchon@cib.csic.es</p>	<p>G lanzmann thrombasthenia is an autosomal recessive bleeding disorder characterized by a life-long hemorrhagic tendency and absent or severely reduced platelet aggregation in response to agonists.<sup>1,2</sup> The thrombasthenic phenotype is associated with quantitative or qualitative abnormalities in the platelet fibrinogen receptor, the <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3 integrin or glycoprotein (GP) IIb-IIIa, which can also serve as a platelet receptor for fibronectin, vitronectin and von Willebrand factor.<sup>3-5</sup> Heterozygous individuals, with 50-60% the normal amount of platelet <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3, have no abnormalities of platelet function and are clinically asymptomatic. The platelet content of <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3 is used to categorize the disease into three types:<sup>1</sup> type I, with total absence of platelet <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3; type II, with &lt; 20% of normal platelet content; and variant Glanzmann thrombasthenia, with a near normal amount of <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3. A number of mutations, distributed worldwide, have been found to be associated with Glanzmann thrombasthenia<sup>6,7</sup> including minor or major deletions, insertions, inversions and mostly point mutations. The functional characterization of many of them has provided important information on the assembly, stability and intracellular transport of the complex.<sup>2</sup></p> <p>Most of the reported single nucleotide substitutions are located in the coding sequence, and they cause missense or nonsense substitutions at the amino acid level, producing either normal-sized non-functional or truncated proteins.<sup>8-9</sup> Mutations that alter mRNA splicing are frequently nonsense mutations<sup>10,11</sup> or mutations directly affecting the standard consensus splicing signals,<sup>12</sup> and typically lead to skipping of the neighboring exon. Less commonly, exonic splicing mutations are missense or even silent mutations that generate an ectopic site<sup>13</sup> that is used preferentially, or activate a cryptic splice site.<sup>14</sup> In nonsense-associated altered splicing, deletion of exons with premature termination codons appears to be mediated, at least in part, by a mechanism in which recognition of the translational reading-frame is involved.<sup>15,16</sup> Exon skipping is</p>

also found in association with an increasing number of point mutations other than those of the nonsense type. Mechanisms involving alteration of pre-mRNA secondary structure and disruption or creation of cis-acting exonic signals, such as exonic splicing enhancers and silencers, have been proposed to explain exon skipping resulting from missense and silent mutations.<sup>18</sup> The production of different isoforms from the same transcription unit is very common in mammalian cells. Alternative splicing forms of the  $\alpha 3$  and  $\alpha$ Ib integrin subunits have been identified during screening of cDNA libraries and the cellular transcripts detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).<sup>11,18</sup> The alternatively spliced form of  $\alpha$ Ib results from an in-frame deletion of a 102 bp of exon 28.<sup>18</sup> As reported for other genes,<sup>19</sup> inherent weak splicing signals for exon 28 may account for its constitutional deletion. The low expression of the deleted transcript and the failure of  $\alpha$ Ib<sup>28</sup> protein to reach the cell surface suggest that it does not have a significant biological function.

We characterize here the genetic defect in a case of type II Glanzmann thrombasthenia caused by compound heterozygosity of the  $\alpha$ Ib gene due to nonsense C1750T and missense C2829T mutations.

## Design and Methods

### Antibodies

Murine monoclonal antibodies specific for  $\beta 3$  (H1AG11) and  $\alpha$ Ib (2BC1) were raised in our laboratory using as antigen  $\alpha$ Ib $\beta 3$  heterodimer isolated from human platelets.<sup>20</sup> The anti- $\alpha$ v $\beta 3$  monoclonal antibody LM609 was from Chemicon (Temecula, CA, USA). The AK2 monoclonal antibody (anti-GPIIb) was from Serotec (Oxford, UK), and SZ1 (anti-GPIX) was from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). Fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit anti-mouse immunoglobulin (Ig) was purchased from Dako A/S (Denmark). The horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

### Case report

The patient is a 2-year-old female from China with a clinical diagnosis of Glanzmann thrombasthenia. She has frequent epistaxes and mucocutaneous hemorrhages that started immediately after birth. The patient's bleeding time was prolonged and she had platelets of normal size and number. Platelet aggregation in response to ADE, collagen, adrenaline and arachidonic acid was less than 5% that of control platelets and no clot retraction was observed. Ristocetin-induced platelet agglutination and plasma fibrinogen content were within the normal range. No information about family antecedents was available since the child was adopted.

### Flow cytometry analysis of platelets surface receptors

Platelet-rich plasma was obtained from venous whole blood by centrifugation at 150 g for 20 min at room temperature. Platelets were sedimented at 1,000 g for 10 min, washed with 0.5 mM EDTA in phosphate-buffered saline, and incubated, at a concentration of  $10^6$  cells/100  $\mu$ L, with the specific monoclonal antibody for 30 min. After washing, the platelets were incubated in a 1:25 dilution of FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit anti-mouse Ig for 20 min. Samples were analyzed in a Coulter flow cytometer, model EPICS XL.

### Binding of fibrinogen to activated platelets

FITC-labeled human fibrinogen was prepared as previously described.<sup>19</sup> The platelet-rich plasma was diluted with HEPES/citrate buffer, pH 7.4 (5 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, 134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 12.9 mM Na citrate, 0.1% glucose, 0.1% bovine serum albumin and 1 mM CaCl<sub>2</sub>) to a final concentration of  $5 \times 10^6$  platelets/mL. Platelets (60  $\mu$ L) were activated for 5 min at room temperature with one or more of the following activating agents: 1 mM dithiothreitol (BRL, Life Technologies Co.), 50  $\mu$ M adenosine 5'-diphosphate (Sigma), 1 mM epinephrine (Sigma). Then, 7.5  $\mu$ g of FITC-fibrinogen were added and, after 15 min at room temperature, platelets were washed and resuspended in HEPES/citrate buffer for flow cytometry analysis.

### Total platelet content of platelet $\alpha$ Ib, $\beta 3$ and $\alpha$ v $\beta 3$

Platelet proteins were solubilized in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.05% Tween 20) supplemented with 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride and 5  $\mu$ L/100  $\mu$ L protease inhibitor cocktail (Sigma). After 20 min on ice, lysates were cleared by centrifugation and resolved on sodium dodecyl sulfate (SDS)-7.5% polyacrylamide gels under non-reduced conditions, transferred to PVDF membranes and then incubated with mixed monoclonal antibodies against  $\alpha$ Ib and  $\beta 3$ . The specific bound antibodies were detected with a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG and visualized using the ECL chemiluminescent system. Western blots were quantified by densitometry scanning of the autoradiographs. To determine the platelet content of  $\alpha$ v $\beta 3$ , 300  $\mu$ g of solubilized platelet protein were pre-cleared and immunoprecipitated for 4 hours at 4°C with 1.5  $\mu$ g of anti- $\alpha$ v $\beta 3$  monoclonal antibody. The immunoprecipitates were treated for 2 hours with protein A-sepharose CL-4B (Amersham Biosciences), washed and eluted by boiling for 10 min in 25  $\mu$ L of non-reduced loading buffer, and analyzed by western blotting with the anti- $\beta 3$  monoclonal antibody as described above.



A. Jayo et al.

### Sequence analysis of reversed transcribed mRNA and genomic DNA fragments of $\alpha$ IIb and $\beta$ 3

Total platelet RNA was obtained using the guanidinium isothiocyanate procedure. Screening for mutations was carried out by direct sequencing of PCR amplified overlapping fragments of reversed transcribed  $\alpha$ IIb and  $\beta$ 3 mRNA. The oligonucleotide pair used for amplification and sequencing of the 3' fragment of  $\alpha$ IIb-cDNA have been previously reported.<sup>14</sup>

Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells. DNA was amplified with Taq polymerase using oligonucleotides from intronic flanking regions. A 890-bp DNA fragment encompassing exons 27 to 29 was amplified using the oligonucleotide pair: sense-intron 26: 5'-atgatggggtgatggccgga-3', and antisense-intron 29: 5'-aacctgggtgtgtgcaactct-3'. The 1468-bp DNA fragment containing exons 13 to 18 was amplified using the oligonucleotide pair: sense-intron 12: 5'-aataacaatcagccactct-3', and antisense-intron 18: 5'-acttggcactaacctaacc-3'. Direct DNA sequencing was performed in an automatic Applied Biosystems sequencer.

### Exontrap analysis

The exontrap vector system (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Germany) was used to analyze whether the C282T mutation in exon 27 alters the splicing pattern of the mutant transcript. Genomic DNA from a control and the patient was used for PCR-amplification of a 890-bp DNA fragment encompassing exons 27-29 and the adjacent regions of introns 26 and 29, as described above. The PCR products were subcloned and cloned into an Xho I-Bam HI digested exontrap vector. Sequence analysis was performed to verify the correct insertion and absence of errors potentially caused by the Taq polymerase. The constructs with the normal or mutant  $\alpha$ IIb sequence were transiently transfected into CHO cells using Lipofectamine reagent (Invitrogen) and, 48 hours after transfection, total RNA was extracted and RT-PCR was performed as previously described.<sup>10</sup>

### Transient expression of wild and mutant $\alpha$ IIb

Expression plasmid containing mutant  $\alpha$ IIb-cDNA was prepared as followed. Total RNA from the patient was used for RT-PCR amplification of a 1114 bp fragment of  $\alpha$ IIb-cDNA, using the sense (1995-2015) and antisense (3129-3109) oligonucleotides, as described above. The PCR product was digested and ligated into the Apa I- and Hind III- digested pcDNA3.1(-)/Myc-His B vector (Invitrogen, San Diego, CA, USA) containing the wild-type  $\alpha$ IIb-cDNA, which was previously treated to disrupt the Apa I site in polylinker. To generate wild and mutant expression plasmids containing the *b* allelic form of the HPA-3 (Ile843Ser) polymorphism, a BamH I cDNA fragment from the patient was exchanged for the corresponding segment in wild and mutant vectors. Nucleotide

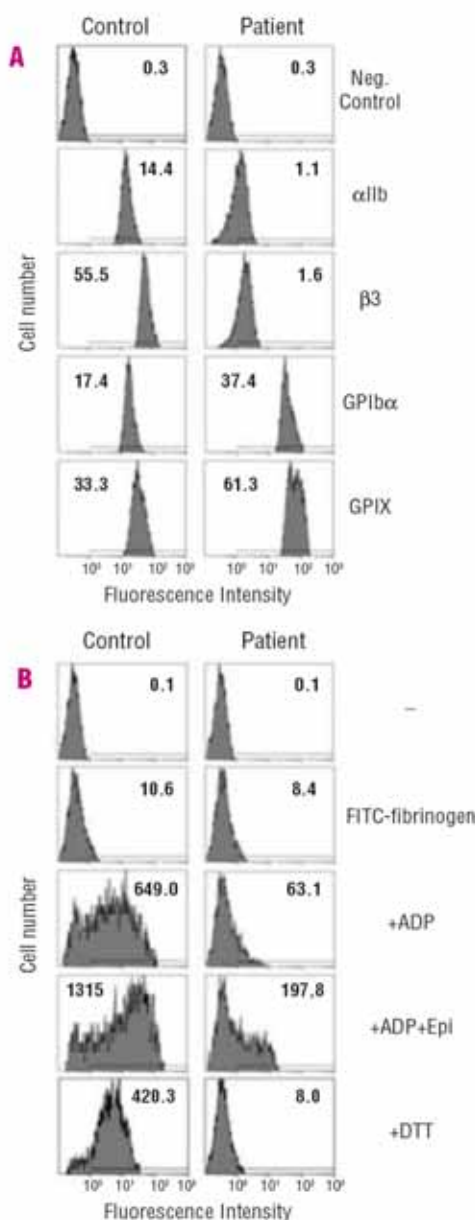
sequencing was performed to verify the correct orientation of the cloned fragments. CHO cells stably expressing  $\beta$ 3 (CHO- $\beta$ 3) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were transiently transfected by the diethyl aminoethyl-dextran method with 15  $\mu$ g of either normal or mutant  $\alpha$ IIb constructs. Forty-eight hours after transfection the cells were harvested and the surface expression of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 complexes was determined by flow cytometry analysis.

## Results

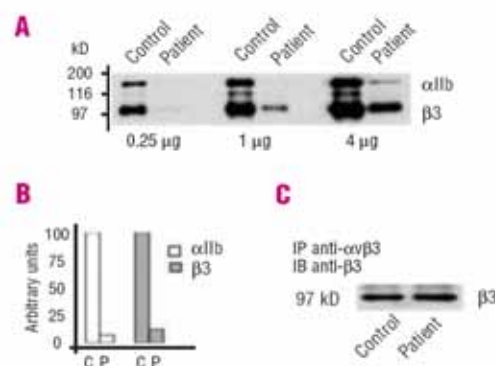
The patient is a 2-year old female from China whose history of bleeding episodes started immediately after birth. The clinical diagnosis of Glanzmann thrombasthenia was based on a prolonged bleeding time, normal platelet count, and absence of spontaneous or agonist-induced platelet aggregation.

The platelet content of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 was estimated by flow cytometry and western blot analysis. As shown in Figure 1A, platelets from the patient incubated with antibodies against  $\alpha$ IIb and  $\beta$ 3 subunits showed detectable positive fluorescence relative to the signal obtained by incubating cells only with the second fluorescent anti-mouse IgG, but the mean fluorescence intensities accounted for less than 10% of surface expression of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 relative to control platelets. The analysis also revealed a normal surface content of the platelet GPIb-IX complex. Quantification of platelet  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by western blot analysis (Figure 2) showed results consistent with those of flow cytometry. The platelet content of  $\alpha$ v $\beta$ 3 was estimated by immunoprecipitation analysis using the monoclonal antibody LM609 that recognizes a site on the  $\alpha$ v $\beta$ 3 vitronectin receptor present when  $\alpha$ v and  $\beta$ 3 are complexed together. As shown in Figure 2, similar amounts of the complex were detected in the patient and the control when the immunoprecipitated proteins were blotted with an anti- $\beta$ 3 monoclonal antibody.

The capacity of Glanzmann thrombasthenia platelets to bind soluble fibrinogen was assessed by incubation in the absence or presence of different activators, and the binding of FITC-fibrinogen was estimated by flow cytometry analysis. As shown in Figure 1B, in response to the stimulation with agonists some of the platelets from the patient exhibited a detectable increase in surface fluorescence. However, the values of fluorescence, calculated as a product of the percent of gated positive cells and the values of mean channel of fluorescence, in the activated platelet population from the patient was approximately 10-fold lower than those in the control. Dithiothreitol stimulated the binding of control platelets to fibrinogen, but no effect was observed on platelets from the patient.



**Figure 1.** Flow cytometry analysis of platelet surface  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  and fibrinogen binding to platelets. (A) Surface expression of  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  and GPIb-IX. Washed platelets were incubated with specific monoclonal antibodies against either  $\alpha\text{IIb}$  (2BC1),  $\beta 3$  (H1AG11), GPIb-IX (AK2), or GPIX (SZ1), as described in the Methods. The negative control represents the fluorescence of platelets incubated only with the second FITC-labeled antibody. The mean channel of fluorescence is indicated in each panel. (B) Binding of soluble fibrinogen to platelets from the thrombasthenic patient and a control. Platelets were processed as described in the Methods and preincubated for 5 min with the indicated activator before addition of FITC-fibrinogen. Numbers correspond to the values of fluorescence calculated as a product of the percent of gated positive cells and the value of mean channel of fluorescence.



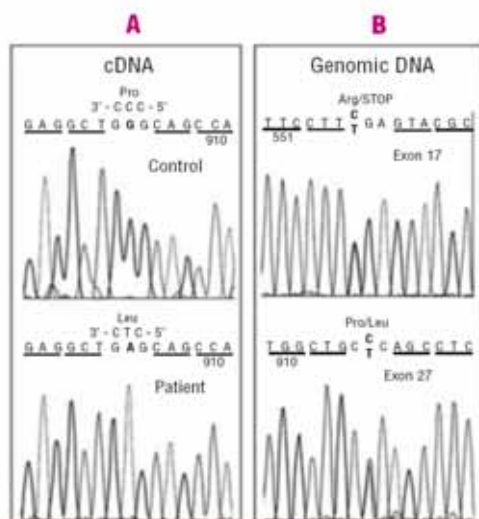
**Figure 2.** Analysis of platelet  $\alpha\text{IIb}$ ,  $\beta 3$  and  $\alpha\text{v}\beta 3$  content. (A) Immunoblot analysis of  $\alpha\text{IIb}$  and  $\beta 3$ . Platelet lysates were resolved on SDS-7.5% polyacrylamide gels under non-reduced conditions and transferred to PVDF membranes. Immunoblotting with 1 μg/mL of the mixed monoclonal antibodies was performed as described in the Methods. (B) The analysis was repeated three times using different protein concentrations and data were quantified by densitometry. (C) Analysis of platelet  $\alpha\text{v}\beta 3$  content. Immunoprecipitation of  $\alpha\text{v}\beta 3$  and western blotting analysis of the immunoprecipitates were performed as described in the Methods.

#### Identification of mutations in the *cd11b* gene

The normal amount of platelet  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  in the patient suggested that the reduced levels of  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  complex were not due to a limited availability of  $\beta 3$ . Thus, we first searched for mutations in the  $\alpha\text{IIb}$  gene by sequencing PCR-amplified overlapping fragments of reversed transcribed  $\alpha\text{IIb}$ -mRNA. This analysis revealed a homozygous single C2829T substitution in exon 27 that would result in the change of Pro to Leu at position 912 in the mature  $\alpha\text{IIb}$  peptide (Figure 3). The analysis also showed homozygosity for the HPA-3 polymorphism that results from a T to G mutation in exon 26 changing Ile843 to Ser.

Since the presence of the mutation could not be evaluated in the biological parents we considered it necessary to verify the homozygous status by analyzing the genomic DNA. Sequence analysis of a DNA fragment encompassing exons 27-29 demonstrated that the patient was heterozygous for the C2829T transition (Figure 3), suggesting the presence of another  $\alpha\text{IIb}$  mutation that would result in absent or very limited amounts of mRNA since no transcripts were detected in the RT-PCR analysis. Thus, we analyzed the coding and partial intronic sequences of  $\alpha\text{IIb}$  by sequencing PCR products encompassing one or more exons. This analysis demonstrated the presence of a heterozygous C1750T transition in the last codon of exon 17 that changes residue Arg553 to STOP codon. The resulting aberrant transcript is predicted to encode a severely truncated  $\alpha\text{IIb}$  subunit consisting of only 552 amino acids, 456 residues shorter than the normal protein, lacking the transmembrane and cytoplasmic domains. These mutations were not found in a significant number of DNA samples

A. Jayo et al.

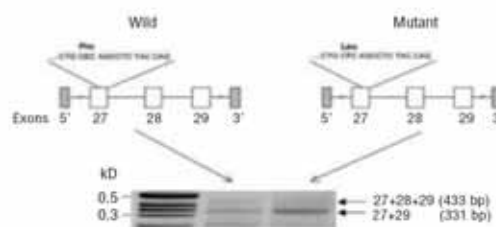


**Figure 3.** Identification of mutations in the  $\alpha IIb$  gene. (A) Direct sequencing of the antisense strand of the 3' overlapping RT-PCR product showing a homozygous G to A substitution that changes Pro to Leu in the Glanzmann thrombasthenia patient. (B) Sequence analysis of genomic DNA fragments revealed the heterozygous status of the missense mutation found in the cDNA (lower panel), and the presence of a nonsense Arg/STOP mutation as result of a C/T transition in the last codon of exon 17 (upper panel).

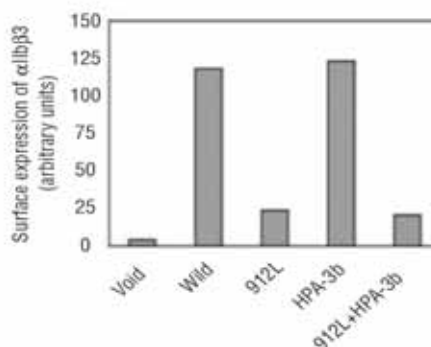
from normal healthy donors. Moreover, no other mutations were identified in the patient after complete analysis of  $\beta 3$  and  $\alpha IIb$  coding sequences.

#### Exontrap analysis of normal and mutant $\alpha IIb$ alleles

$\alpha IIb$  mRNA with deleted exon 28 ( $\alpha IIb$ -28) is a rare alternatively spliced product found in normal platelets. However, a significantly increased number of deleted forms of the transcript was observed in the patient when the DNA sequence of individual clones was analyzed (data not shown). To determine whether the C2829T transition induces skipping of exon 28 we analyzed the splicing of this portion of the  $\alpha IIb$  gene transfected into CHO cells, using the exontrap vector system. Figure 4A schematically displays the minigene constructs used in these experiments. We examined the  $\alpha IIb$  transcripts generated from the normal and mutant alleles by RT-PCR. The construct containing the wild sequence yielded products of similar intensity of approximately 400 and 300 bp. However, a near 100% relative increase of the 300 bp product, as quantified by densitometry scanning, was observed in the RT-PCR analysis of cells transfected with the mutant C2829T construct (Figure 4). Sequence analysis revealed that the amplified products correspond to normal and exon 28 deleted forms of the  $\alpha IIb$  transcript.



**Figure 4.** Exontrap analysis of  $\alpha IIb$  genomic fragments. Fragments of normal and mutant genomic DNA of  $\alpha IIb$  were cloned into the expression vector pET01, in which the intron containing the multi-cloning site is framed by the 5' donor and 3' acceptor splice sites. CHO cells were transiently transfected with the normal or mutant  $\alpha IIb$  construct and the splicing patterns deduced by agarose gel and sequence analysis of the RT-PCR products, as described in the Methods.



**Figure 5.** Surface expression of  $\alpha IIb\beta 3$  in transiently transfected CHO- $\beta 3$  cells. CHO cells stably expressing  $\beta 3$  subunit were transfected with pcDNA3 plasmid containing either normal or mutated  $\alpha IIb$  cDNAs. Forty-eight hours after transfection the surface expression of  $\alpha IIb\beta 3$  complexes was determined by flow cytometry using the 2Bc1 monoclonal antibody. The fluorescence values were calculated as a product of the percent of gated positive cells and the value of the mean channel of fluorescence. Data are representative of three independent transfection experiments.

#### Transient expression of mutant forms of $\alpha IIb$ in CHO- $\beta 3$ cells

Figure 5 depicts the results obtained by expressing either normal [912P] $\alpha IIb$  or mutant [912L] $\alpha IIb$  into CHO cells that stably express  $\beta 3$  on the cell surface associated with endogenous  $\alpha$  subunits (CHO- $\beta 3$  cells). In view of the simultaneous presence and close proximity of the mutated residue and the HPA-3b polymorphism (843Ser), we also analyzed the effect of transfecting  $\alpha IIb$ -cDNA containing both substitutions. The rate of surface exposure of  $\alpha IIb\beta 3$  complexes was similar in cells transfected



with either normal or polymorphic  $\alpha$ IIb-cDNA. However, the P912L substitution markedly decreased the expression of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 complexes at the cell surface in the presence of both forms of the HPA-3 polymorphism.

## Discussion

The present work was aimed at investigating the molecular basis of the bleeding disorder presented by a patient with a clinical phenotype of Glanzmann thrombasthenia. The platelet content of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, assessed by flow cytometry and western analysis, indicated that the patient had type II Glanzmann thrombasthenia. The normal expression of platelet  $\alpha$ v $\beta$ 3 suggested that a limited availability of  $\alpha$ IIb, but not of  $\beta$ 3, subunit was involved in the etiopathogenesis of the disease.

Sequence analysis of  $\alpha$ IIb-cDNA from the patient revealed the presence of a C to T homozygous transition at position 2829 in exon 27. The predicted effect of this mutation is the P912L substitution in  $\alpha$ IIb. The simultaneous homozygosity of the HPA-3 polymorphism, together with the impossibility of performing genetic analysis in the parents, led us to confirm the presence of a unique mutation at the DNA level. Sequencing of the corresponding genomic DNA fragment revealed that the mutation was present in only one allele and that the patient was carrying another point substitution: a C1750T transition in the last codon of exon 17 that creates a premature termination stop codon in the 553Arg position and does not produce mRNA detectable in our experimental conditions of PCR amplification. This nonsense mutation had been previously found in a heterozygous state in six unrelated patients: three from China, two from Japan and one from France.<sup>8</sup> Since no polymorphic changes were detected at this position in 107 normal individuals from a Chinese province<sup>9</sup> the site might represent a mutational hotspot in the  $\alpha$ IIb gene. In principle, the failure to detect the mutant C1750T transcript is consistent with the abnormal transcript being removed by nonsense-mediated decay.<sup>18</sup> The predicted mutant transcript would encode a truncated  $\alpha$ IIb protein, 456 residues shorter than the normal protein, lacking the transmembrane and cytoplasmic domains, and a portion of the extracellular carboxyterminal fragment. However, cDNA sequence analysis in one of the reported cases, in which the trace amounts of the aberrant mRNA could be amplified due to the complete inactivation of the other  $\alpha$ IIb allele,<sup>21</sup> demonstrated a markedly reduced amount of a transcript containing a 75-bp deletion in the 3' boundary of exon 17 that would code for a protein carrying an in-frame deletion of 25 residues.

Since the C1750T mutation generates trace amounts of mRNA, the total  $\alpha$ IIb protein detected in the patient would, in practice, come from the C2829T mutant allele. The C2829T substitution is the first reported mutation located in exon 27 of  $\alpha$ IIb, which codes for the aminoter-

минаl region of the light  $\alpha$ IIb chain. Transient transfection experiments demonstrated that [912L] $\alpha$ IIb resulting from the C2829T transition can be expressed at the cell surface as an  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 complex. However, the 5-fold reduction in the rate of expression indicates some restriction in one or more of the steps involved in the maturation and traffic of the complex.

Unexpectedly, analysis of this mutation at the mRNA level revealed a significant increase in the number of transcripts in which exon 28 was deleted. This association was confirmed by exontrapping analysis of genomic DNA encompassing either the normal or mutated exon 27, which demonstrated that the identified mutation was forcing skipping of exon 28 in  $\alpha$ IIb-mRNA.  $\alpha$ IIb with deleted exon 28 ( $\alpha$ IIb<sup>28</sup>) is a rare, alternatively spliced product of the  $\alpha$ IIb transcript that may represent approximately 3% of the normally spliced form in control platelets.<sup>22</sup> Skipping of exon 28 has been previously reported to increase as a result of two different mutations in this exon. In one case the mutation created a stop in the last codon of exon 28 and, at the same time, changed the consensus 5' splice site of intron 28 forcing the exon deletion in virtually all the transcripts.<sup>23</sup> In contrast, the 5-bp duplication reported by Peretz *et al.*<sup>23</sup> abolished the normal stop codon without creating a new one and, as in the case reported here, a significant amount of non-deleted transcript was detected. In both cases, as observed in our study, the transcriptional rate and intracellular stability of the  $\alpha$ IIb<sup>28</sup> mRNA seemed not to be decreased with respect to the normal transcript. However, it was not expressed as a stable  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 heterodimer at the surface of either platelets or transfected cells.<sup>23,24</sup> According to these observations, the platelet  $\alpha$ IIb in the present patient with Glanzmann thrombasthenia would come from the normal size transcript. The defective mRNA splicing promoted by the mutation may explain the discrepancy between the relative percents of expression of the mutant protein observed in platelets (less than 10% of the control) and transfected cells (20% of the control). Skipping of the mutant exon is a common mechanism of gene inactivation induced by single point mutations; nevertheless, it is less frequent that, as in this case of Glanzmann thrombasthenia, the mutation affected splicing of a contiguous or remote exon.<sup>18,25,26</sup> The presence of weak splicing signals in the deleted exons seems to be a common requisite in all cases. However, in contrast to other reports,<sup>18,25,26</sup> the  $\alpha$ IIb mutation does not introduce a premature stop codon into the transcript.

The effects of nonsense mutations on the stability and splicing of mRNA have been extensively studied leading to the proposal that the reading frame undergoes surveillance before splicing.<sup>27</sup> However, less is known about the mechanism involved in altered splicing caused by missense mutations. Since exon skipping can also be associated with apparently silent mutations, it has been suggested that both missense and silent mutations must

A. Jayo et al.

act altering *cis*-sequences that are important for correct splicing.<sup>18</sup> Binding of serine/arginine-rich (SR) proteins to such exonic splicing enhancer (ESE) or silencer (ESS) sequences can promote exon definition by modulating recruitment of the splicing machinery. Disruption of these exonic splicing sequences has been proposed as the underlying mechanism in a number of mutations.<sup>28,30</sup> Potential ESE that would facilitate recognition of splice sites and prevent exon skipping can be identified computationally but, in many instances, it is difficult to predict whether a mutation will alter splicing based on sequence alone. The scores for individual SR protein putative recognition sites, estimated by using the available ESEfinder program,<sup>28</sup> were not decreased in the mutant C2829T sequence. Paradoxically, the mutation was predicted to increase the score of a site for the SR protein SC35 from 2.418530 to 3.062970 (threshold value for the SC35 motif: 2.383). Although exon skipping has been coupled to disruption of SR sites,<sup>18</sup> it has also been shown to be promoted by overexpression of the SC35 splicing factor.<sup>32,33</sup>

The proportion of mutations identified at the DNA level which are predicted to affect mRNA splicing has often been underestimated.<sup>28,34</sup> Many recent reports show an increasing number of human genetic diseases due to exonic mutations that alter pre-mRNA processing.<sup>18</sup> In some instances, the identification of alternative transcripts may be the only way to explain the mechanism by which a mutation is causing a disease. The mutations identified in the present study are examples of genetic defects which need to be characterized at both the genomic and RNA levels in order to obtain a correct interpretation of their pathogenetic mechanism. The functional consequences of the C2829T substitution suggest that, as reported for another human diseases, disruption of exonic splicing elements may represent the underlying, so far underestimated, mechanism of gene inactivation dis-

played by a number of Glanzmann thrombasthenia mutations. Finally, in the present patient with Glanzmann thrombasthenia the HPA-3a (843Ile) allele is silent at the protein level. HPA-3 (Ile843Ser) is a common polymorphism of platelet  $\alpha$ IIb that gives rise to post-transfusion purpura and neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura.<sup>35</sup> Thus, this case is an example in which the genotype analysis without complementary serological typing could have led in some circumstances to misinterpretation of clinical symptoms. As reported for the HPA-1 polymorphism of  $\beta$ 3, HPA-3 seems not to be associated with any measurable increase of the risk for cardiovascular disease.<sup>36</sup> However, in a post-stroke mortality study, patients with the *a* allele had a worse survival than those homozygous for the *b* allele.<sup>37</sup>

In summary, in the present work we have analyzed the pathogenic mechanism in a thrombasthenic patient carrying two mutations in exons 17 and 27 of the  $\alpha$ IIb subunit. The reduced  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in the platelet membrane seems to be the result of unstable  $\alpha$ IIb mutant transcripts, enhanced expression of aberrant  $\alpha$ IIb<sup>38</sup> transcripts, and inefficient processing of [912Leu] $\alpha$ IIb protein. The detected binding of labeled fibrinogen suggests that the expressed mutant protein might be functional but not sufficient to support platelet aggregation.

*AJ performed the mRNA and DNA sequence analysis and prepared the construct plasmids for transfections; DP carried out the transfection experiments; PL performed the cytometry analysis of platelets and participated in manuscript preparation; VJ conducted the clinical study of the patient and platelet aggregation analysis; CG-M coordinated the study and drafted the paper.*

*Funding:* this work was supported by a grant from the Dirección General de Investigación of the Ministerio de Educación y Ciencia (BMC2003-01409). A. Jayo is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

*Manuscript received May 10, 2006. Accepted July 18, 2006.*

## References

- Caen JP. Glanzmann's thrombasthenia. *Clin Haematol* 1989;2:609-25.
- Bellucci S, Caen J. Molecular basis of Glanzmann's thrombasthenia and current strategies in treatment. *Blood Rev* 2002;16:193-202.
- Nurden AT, Caen JP. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet functions. *Nature* 1975; 255:720-2.
- Pytela RE, Piensbach MD, Ginsberg MH, Flow EF, Ruoslahti E. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science* 1986;231:1559-62.
- Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa. The responsive integrin. *Cell* 1991; 65:359-62.
- <http://www.sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann>
- <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>
- French DL, Collier BS. Hematologically important mutations: Glanzmann thrombasthenia. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 23:39-51.
- French DL. The molecular genetics of Glanzmann's thrombasthenia. *Platelets* 1998;9:5-20.
- Tao J, Arias-Salgado EG, González-Manchón C, Díaz-Cremades J, Ayuso MS, Parrilla R. A novel [288delC] mutation in exon 2 of GPIIb associated with type I Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol* 2000;111:96-103.
- Arias-Salgado EG, Tao J, González-Manchón C, Butta N, Vicente, Ayuso MS, et al. Nonsense mutation in exon-19 of GPIIb associated with thrombasthenic phenotype. Failure of GPIIb ( $\Delta$ 597-1008) to form stable complexes with GPIIla. *Thromb Haemost* 2002; 87:684-91.
- González-Manchón C, Arias-Salgado EG, Butta N, Martín G, Rodríguez RB, Elalamy I, et al. A novel homozygous splice junction mutation in GPIIb associated with alternative splicing, nonsense-mediated decay of GPIIb-mRNA, and type II Glanzmann's thrombasthenia. *J Thromb Haemost* 2003;1:1071-8.
- Xie J, Fabbón D, Jayo A, Butta N, González-Manchón C. Type I Glanzmann thrombasthenia caused by an apparently silent  $\beta$ 3 mutation that results in aberrant splicing and reduced  $\beta$ 3 mRNA. *Thromb Haemost* 2005; 93:897-905.
- González-Manchón C, Fernández-Pinel M, Arias-Salgado EG, Ferrer M, Alvarez MV, García-Muñoz S, et al. Molecular genetic analysis of a compound heterozygote for the GPIIb gene associated with Glanzmann's thrombasthenia. Disruption of the 674-687 disulfide bridge in GPIIb prevents surface expression of GPIIb-IIIa. *Blood* 1999; 93:866-75.
- Cartegni L, Chew SI, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;3:285-98.
- Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:89-99.
- Van Kuppevelt THMSM, Languino LR, Gailit JO, Suzuki S, Ruoslahti E. An alternative cytoplasmic domain of the



- integrin β3 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5415-8.
18. Bray PE, Leung CS, Shuman MA. Human platelets and megakaryocytes contain alternately spliced glycoprotein IIb mRNAs. *J Biol Chem* 1990; 265:9587-90.
  19. Ohno K, Milone M, Shen X-M, Engel AG. A frameshifting mutation in CHRNE unmasks skipping of the preceding exon. *Hum Mol Genet* 2003; 12:3055-66.
  20. Butta N, Arias-Salgado EG, González-Manchón C, Ferrer M, Laruacea S, Ayuso MS, et al. Disruption of the β3 663-687 disulfide bridge confers constitutive activity to β3 integrins. *Blood* 2003;102:2491-7.
  21. Tomiyama Y, Kashiwagi H, Kosugi S, Shiraga M, Kanayama Y, Kurata Y, et al. Abnormal processing of the glycoprotein IIb transcript due to a nonsense mutation in exon 17 associated with Glanzmann's thrombasthenia. *Thromb Haemost* 1995;73:756-62.
  22. Iwamoto S, Nishiumi E, Kajii E, Ike-moto S. An exon 28 mutation resulting in alternative splicing of the glycoprotein IIb transcript and Glanzmann's thrombasthenia. *Blood* 1994;83:1017-23.
  23. Peretz H, Rosenberg N, Landau M, Usher S, Nelson EJR, Mor-Cohen R, et al. Molecular diversity of Glanzmann's thrombasthenia in Southern India. New insights into mRNA splicing and structure-function correlations of αIIbβ3 integrin (ITGA2B, ITGB3). *Hum Mut* 2006;27:359-69.
  24. Kolodziej MA, Vilare G, Rifat S, Poncz Mortimer, Bennett JS. Effect of deletion of glycoprotein IIb exon 28 on the expression of the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood* 1991;78:2344-53.
  25. Clarke LA, Veiga I, Isidro G, Jordan P, Ramos JS, Castedo S, et al. Pathological exon skipping in a HNPCC proband with MLH1 splice acceptor site mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:367-70.
  26. Hsu BY, Iacobazzi V, Wang Z, Harvie H, Chalmers RA, Saudubray JM, et al. Aberrant mRNA splicing associated with coding region mutations in children with carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Mol Gen Metab* 2001;74:248-55.
  27. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 2004;36:801-8.
  28. Liu HX, Cartegni L, Zhan MQ, Krainer AR. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet* 2001;27:55-8.
  29. Aznarez I, Chan EM, Zielenski J, Blencowe BJ, Tsui LC. Characterization of disease-associated mutations affecting an exonic splicing enhancer and two cryptic splice sites in exon 13 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Mol Genet* 2003;12:2031-40.
  30. Tong A, Nguyen J, Lynch KW. Differential expression of CD45 isoform is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons. *J Biol Chem* 2005; 280:38297-304.
  31. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Res* 2003;31: 568-71.
  32. Jiang Z, Zhang W, Rao Y, Wu JY. Regulation of lch-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9155-60.
  33. Lemaire L, Winne A, Sarkissian M, Lafyatis R. SF2 and SRp55 regulation of CD45 exon 4 skipping during T cell activation. *Eur J Immunol* 1999; 29: 823-37.
  34. Ars E, Serra E, García J, Krueyer H, Gaona A, Lázaro C, et al. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 2000;9:237-47.
  35. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, and Newman PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb allo-antigen system. *Blood* 1990; 75:2343-8.
  36. Bottiger C, Kastrati A, Koch W, Mehili J, Seidl H, Schomig K, et al. HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000;83:559-62.
  37. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Association of the platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism with survival after acute ischemic stroke. *Stroke* 1999;30:2606-11.

## 8. 3. Artículo 3.

## Platelets and Blood Cells

Type I Glanzmann thrombasthenia caused by an apparently silent  $\beta 3$  mutation that results in aberrant splicing and reduced  $\beta 3$  mRNA

Jingli Xie, Dina Pabón, Asier Jayo, Nora Butta, Consuelo González-Manchón

Department of Pathophysiology and Human Molecular Genetics, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain

## Summary

We report a novel genetic defect in a patient with type I Glanzmann thrombasthenia. Flow cytometry analysis revealed undetectable levels of platelet glycoproteins  $\alpha IIb$  and  $\beta 3$ , although residual amounts of both proteins were detectable in immunoblotting analysis. Sequence analysis of reversely transcribed platelet  $\beta 3$  mRNA showed a 100-base pair deletion in the 3'-boundary of exon 11, that results in a frame shift and appearance of a premature STOP codon. Analysis of the corresponding genomic DNA fragment revealed the presence of a homozygous C1815T transition in exon 11. The mutation does not change the amino acid residue but it creates an ectopic consensus splice donor site that is used preferentially, causing splicing out of part

of exon 11. The parents of the proband, heterozygous for this mutation, were asymptomatic and had reduced platelet content of  $\alpha IIb\beta 3$ . PCR-based relative quantification of  $\beta 3$  mRNA failed to detect the mutant transcript in the parents and showed a marked reduction in the patient. The results suggest that the thrombasthenic phenotype is, mainly, the result of the reduced availability of  $\beta 3$ -mRNA, most probably due to activation of the nonsense-mediated mRNA decay mechanism. They also show the convenience of analyzing both genomic DNA and mRNA, in order to ascertain the functional consequences of single nucleotide substitutions.

## Keywords

Platelets,  $\alpha IIb\beta 3$ , thrombasthenia, splicing mutation

Thromb Haemost 2005; 93: 897-903

## Introduction

Glanzmann thrombasthenia (GT) is an autosomal recessive bleeding disorder with a worldwide distribution, characterized by a life-long haemorrhagic tendency and absence or severely reduced platelet aggregation in response to agonists (1, 2). The disease is caused by quantitative or qualitative abnormalities in the platelet fibrinogen receptor, the  $\alpha IIb\beta 3$  integrin or glycoprotein (GP) IIb-IIIa, which can also serve as platelet receptor for fibronectin, vitronectin and von Willebrand factor (3-5). Obligate heterozygotes, with 50-60% the normal amount of platelet  $\alpha IIb\beta 3$ , have no abnormalities of platelet function and are clinically asymptomatic (2). GT has been categorized into three types depending on the amount of detectable  $\alpha IIb\beta 3$  complex (1): type I, <5%; type II, with 10-20%; and variant GT, with near normal expression of  $\alpha IIb\beta 3$ . Since the cloning of  $\alpha IIb$  and  $\beta 3$  genes, a

number of mutations have been identified associated with GT (6, 7) including minor or major deletions, insertions, inversions and mostly point mutations. The molecular and functional characterization of many of them has provided important information on the biosynthesis and structure-function relationships of platelet  $\alpha IIb\beta 3$  as well as about the biology of other molecules of the integrin family (8, 9). Most of the reported single nucleotide substitutions associated to GT are located in the coding sequence, and they cause missense or nonsense substitutions at the amino acid level, producing either normal-sized non-functional or truncated proteins (10-12). Truncated proteins have also been reported to be the predicted result of mutations that induce aberrant splicing of the pre-mRNA and, consequently, shift of the reading frame and appearance of a premature termination codon. Most of these mutations are located within the exonic or intronic sequences of the splice junctions (13-15). Only two cases of GT

Correspondence to:  
Consuelo González-Manchón  
Department of Pathophysiology and  
Human Molecular Genetics  
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)  
Ramón de Maeztu, 9  
28040-Madrid, Spain  
Fax: 34-91-5360432  
E-mail: cgmanchon@cib.csic.es

Received September 28, 2004  
Accepted after resubmission January 21, 2005

Financial support:  
Supported in part by grants from the Dirección General de Investigación (SAF 2000-0127 and BMC2003-01409), and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FS-P021263). N. Butta is recipient of a tenure track grant. Ramón y Cajal from the Spanish Ministry of Science. J. Xie and A. Jayo are recipients of fellowships from the Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI, Ref. 2002CN0004) and Ministerio de Educación y Ciencia, respectively.

Prepublished online ■, 2005 DOI: 10.1160/TH04-09-0633

have been found to be associated to splicing defect caused by exonic sequence variations located outside from the canonical exon-intron boundaries (16, 17). However, many of the GT mutations were not analyzed at the mRNA level. Therefore, as reported for other genes (18, 19), it is probable that an important number of the previously identified substitutions could be categorized as splicing mutations if they were studied both at the mRNA and genomic levels.

In this report, we characterize the genetic defect in a case of type I GT. The proband is homozygous for two point mutations in exon 11 of  $\beta 3$ : C1815T, apparently silent at the translational level; and A1843G, which is predicted to change Ile589 to Val. Analysis of the mRNA by RT-PCR and exon trapping assays indicate that the C1815T substitution introduces an additional splice donor site inside the exon. This new site is used preferentially over the downstream authentic splice site, resulting in frame shift due to the deletion of 100 bp, and the appearance of a premature stop codon. Thus, the thrombasthenic phenotype of the proband seems to be associated with a limited availability of the deleted  $\beta 3$ -mRNA as a consequence of activation of non-sense-mediated mRNA decay.

## Materials and methods

### Antibodies

Murine monoclonal antibodies (mAb) specific for  $\beta 3$  (713H7) and  $\alpha IIb$  (701E5) were raised in our laboratory using as antigen  $\alpha IIb\beta 3$  heterodimer isolated from human platelets (15). The anti- $\alpha v\beta 3$  mAb LM609 was from Chemicon (Temecula, CA, USA). Fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit anti-mouse immunoglobulin (Ig) was purchased from Dako A/S (Denmark). The horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

### Case report

The patient is a 3-year-old male from Lebanon with clinically diagnosed Glanzmann thrombasthenia (GT) with frequent epistaxis and mucocutaneous hemorrhages that started immediately after birth. His parents, who are first cousins, are asymptomatic. The patient showed prolonged bleeding time and platelets of normal size and number. Platelet aggregation in response to ADP, thrombin, collagen and adrenaline was absent. Ristocetin-induced platelet agglutination was normal. Plasma fibrinogen content was within the normal range and no clot retraction was observed.

### Flow cytometry analysis of platelets surface receptors

Platelet-rich-plasma (PRP) was obtained from venous whole blood by centrifugation at 150 g for 20 min at room temperature. Platelets were sedimented at 1,000 g for 10 min, washed with 0.5 mM EDTA in phosphate-buffered saline (PBS), and incubated, at a density of  $10^6$  cells/100  $\mu$ l, with the specific mAb for 30 min. After washing, the platelets were incubated in a 1:25 dilution of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit anti-mouse Ig for 20 min. Samples were analysed in a Coulter flow cytometer, model EPICS XL.

### Binding of fibrinogen to activated platelets

FITC-labeled human fibrinogen (Fg) was prepared as previously described (20). The PRP was diluted with Hepes/citrate buffer, pH 7.4 (5 mM Hepes, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, 134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 12.9 mM sodium citrate, 0.1% glucose, 0.1% bovine serum albumin and 1 mM CaCl<sub>2</sub>) to a final concentration of  $5 \times 10^7$  platelets/ml. Platelets (60  $\mu$ l) were activated for 5 min at room temperature with one or more of the following activating agents: 10 mM dithiothreitol (DTT) (BRL, Life Technologies, Co.), 20 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma), 100  $\mu$ M adenosine 5'-diphosphate (ADP) (Sigma), 1 mM (-)-epinephrine (Sigma). To prevent the binding of Fg to integrins the platelets were preincubated with 2 mM RGDS peptide or 20 mM EDTA. Then, 7.5  $\mu$ g of FITC-Fg was added and, after 15 min at room temperature, platelets were washed and resuspended in Hepes/citrate buffer for flow cytometry analysis.

### Total platelet content analysis of $\alpha IIb$ , $\beta 3$ and $\alpha v\beta 3$

Platelet proteins were solubilized in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.05% Tween 20) supplemented with 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) and 5  $\mu$ l/100  $\mu$ l protease inhibitor cocktail (Sigma). After 20 min on ice, lysates were cleared by centrifugation and resolved on sodium dodecyl sulfate (SDS)-7.5% polyacrylamide gels under non-reduced conditions, transferred to PVDF membranes and, then, incubated with mAbs against either  $\alpha IIb$  or  $\beta 3$ . The specific bound antibodies were detected with a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG and visualized using the ECL chemiluminescent system. Western blot quantification was performed by densitometry scanning of the autoradiograph.

To determine the platelet content of  $\alpha v\beta 3$ , 300  $\mu$ g of solubilized platelet protein were pre-cleared and immunoprecipitated for four hours at 4°C with 1.5  $\mu$ g of anti- $\alpha v\beta 3$  mAb. The immunoprecipitates were treated for two hours with protein A-sepharose CL-4B (Amersham Biosciences), washed and eluted by boiling 10 min in 25  $\mu$ l of non-reduced loading buffer, and analyzed by western blotting with the anti- $\beta 3$  mAb as described above.

### Sequence analysis of reversed transcribed mRNAs and genomic DNA fragments of $\alpha IIb$ and $\beta 3$

Total platelet RNA was obtained according to the method of Chomczynsky and Sacchi (21). Screening for mutations was carried out by direct sequencing of PCR amplified overlapping fragments of reversed transcribed  $\alpha IIb$  and  $\beta 3$  mRNAs. The oligonucleotide pair used for amplification and sequencing of the 3' fragment of  $\beta 3$ -cDNA were: sense (1187-1207): 5'-TCAATGCCACCTGCCTCAACA-3' and antisense (2407-2387): 5'-TGGCACAGGCTGATAATGATE-3'.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells. Amplification of DNA was carried out with Taq polymerase according to the protocol recommended by Perkin-Elmer Roche (New Jersey, USA). A 1335-bp DNA fragment encompassing exons 11 and 12 was amplified using the oligonucleotide pair: sense-intron 10: 5'-ACCTTCCTGGGCTGTGTGTTTCA-3', and antisense-intron 12: 5'-AACCTGGGTGTGTGCAACTCT-3', and direct DNA sequencing was performed in an automatic Applied Biosystems sequencer.

### PCR-based relative quantification of $\beta 3$ -mRNA

A series of 30  $\mu$ l reverse transcription reactions were performed using the antisense oligonucleotides:  $\beta 3$ -AS (2407–2387) or  $\alpha$ IIb-AS: 5'-CAACCTCCTGCTAGAATAGT-3', and a constant concentration of total platelet RNA from the proband, his parents, and a control. After cDNA synthesis, 10  $\mu$ l aliquots were used as templates in 25, 30 and 40-cycle PCR reactions, using the sense oligonucleotides:  $\beta 3$ -S (1187–1207) or  $\alpha$ IIb-S: 5'-AGTTGGGGCAGATAATGTCCT-3', to amplify cDNA fragments of 1221 or 1190 bp, respectively. The PCR products were then resolved on a 1.2 % agarose gel, visualized by ethidium bromide staining, and analyzed by densitometry.

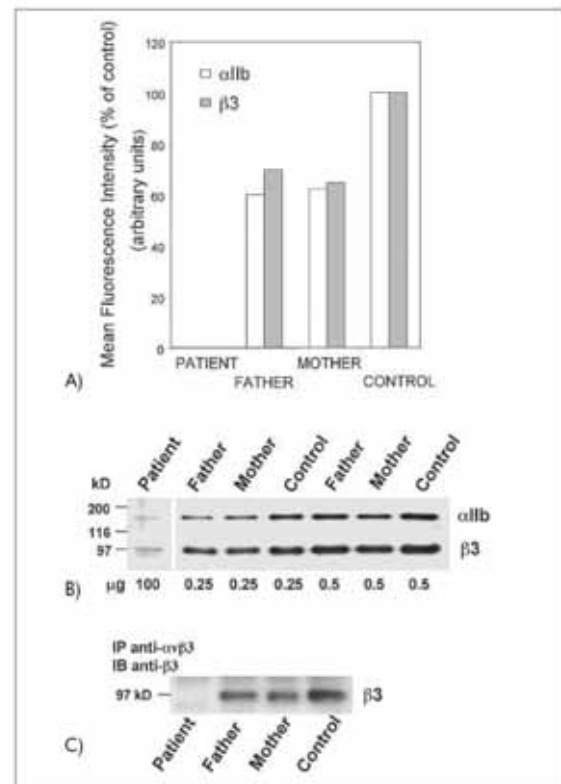
### Exontrap analysis

The exontrap vector system (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Germany) was used to analyze the splicing pattern of the identified mutant transcript. Genomic DNA from a control and the patient were used for PCR-amplification of a 1335-bp DNA fragment encompassing exons 11–12 and the adjacent regions of introns 10 and 12, as described above. The PCR products were blunted-end and cloned into the Sma I digested exontrap vector. Sequence analysis was performed to verify the correct insertion and absence of errors potentially caused by the Taq polymerase. The constructs with the normal or mutant  $\beta 3$  sequence were transiently transfected into CHO cells by the calcium phosphate precipitation method and, 48 hours after transfection, total RNA was extracted and RT-PCR was performed as previously described (22).

## Results

The patient is a 3-year-old male from Lebanon with a lifelong history of frequent epistaxis and mucocutaneous bleeding. The clinical diagnosis of Glanzmann thrombasthenia (GT) was established by the prolonged bleeding time, normal platelet count, and absence of spontaneous or agonist-induced platelet aggregation. Her parents, who are first cousins, did not suffer from any hemorrhagic diathesis and had normal platelet aggregation.

The platelet content of  $\alpha$ IIb $\beta 3$  was estimated by flow cytometry and blotting analysis. As represented in Figure 1A, platelets from the patient incubated with antibodies against  $\alpha$ IIb or  $\beta 3$  subunits showed undetectable positive fluorescence relative to the signal obtained by incubating cells with only the second fluorescent anti-mouse IgG, indicating that he suffers of type I GT. The parents showed reduced platelet fluorescence relative to the control platelets accounting, approximately, for a 40% decrease in the surface content of  $\alpha$ IIb $\beta 3$ . The estimation of platelet  $\alpha$ IIb $\beta 3$  content by western blotting analysis (Fig. 1B) showed results consistent with those of flow cytometry, that is, reduced  $\alpha$ IIb $\beta 3$  signals in the parents, and a residual platelet content of  $\alpha$ IIb and  $\beta 3$  in the proband, detectable only when the gels were overloaded with 100  $\mu$ g platelet protein and the exposure time of the autoradiography film increased. The patient  $\alpha$ IIb $\beta 3$  expression, estimated by densitometry scanning, was at least 400-fold less than the content in the parents. The platelet content of  $\alpha$ v $\beta 3$  was estimated by immunoprecipitation analysis using the mAb LM609 that recognizes a site on the  $\alpha$ v $\beta 3$  vitronectin receptor present when  $\alpha$ v and  $\beta 3$  are complexed to-

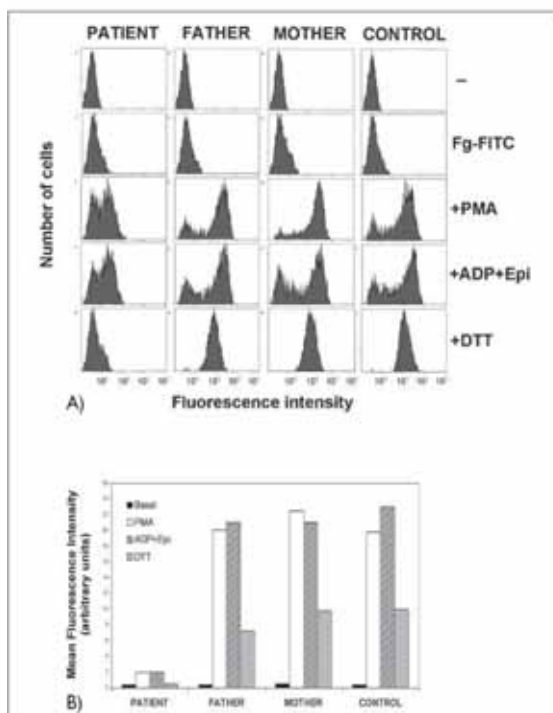


**Figure 1: Analysis of platelet  $\alpha$ IIb,  $\beta 3$  and  $\alpha$ v $\beta 3$  content in the thrombasthenic patient and his parents.** (A) Flow cytometry analysis of the  $\alpha$ IIb and  $\beta 3$  content. Washed platelets were incubated with specific mAbs against either  $\alpha$ IIb (701E5) or  $\beta 3$  (713H7) as described in Materials and methods. The bar graph shows the values of the mean fluorescence levels in arbitrary units expressed as percentages of control platelets. (B) Western blot analysis of the  $\alpha$ IIb and  $\beta 3$  content. Platelet lysates were resolved on SDS-7.5% polyacrylamide gels under non-reduced conditions and transferred to PVDF membranes. Immunoblotting with 1  $\mu$ g/ml of the monoclonal antibodies was performed as described in Materials and methods. The experiment was repeated three times using different protein concentrations. (C) Analysis of platelet  $\alpha$ v $\beta 3$  content. Immunoprecipitation of  $\alpha$ v $\beta 3$  and western blotting analysis of the immunoprecipitates were performed as described under Materials and methods.

gether. As shown in Figure 1C, no complex was detected in the patient when the immunoprecipitated proteins were blotted with an anti- $\beta 3$  mAb.

To assess the capacity of the GT platelets to bind soluble Fg, they were incubated in the absence or presence of different activators, and the binding of FITC-Fg was estimated by flow cytometry analysis. In response to the stimulation with agonists and the post-receptor activation with phorbol ester (PMA), approximately 50% of the platelets from the patient exhibited a detectable increase in surface fluorescence (Fig. 2A) that was partially prevented by either RGDS peptide or pre-treatment with EDTA (results not shown). However, as quantified in Figure 2B, the



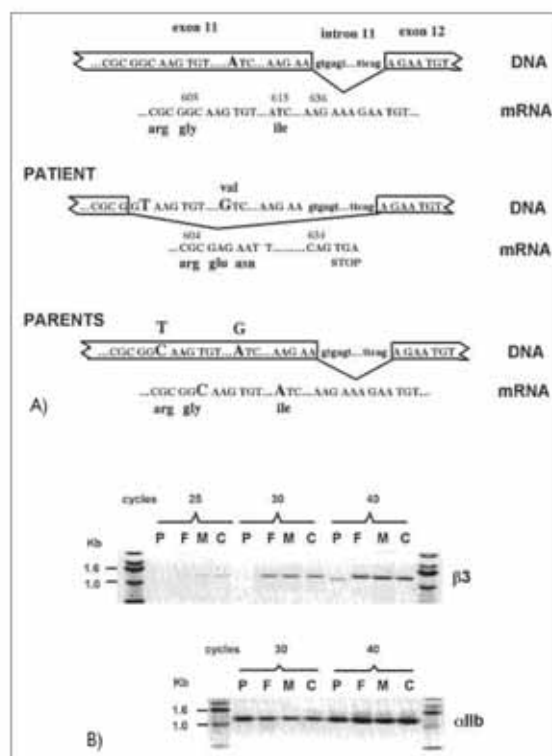


**Figure 2: Analysis of fibrinogen binding to platelets from the thrombasthenic patient and his parents.** (A) Platelets were processed as described in Materials and methods, and the binding to FITC-Fg was determined by flow cytometry. Where indicated, the platelets were stimulated with 20 nM PMA, 100  $\mu$ M ADP plus 1 mM (-)epinephrine, or 10 mM DTT, before FITC-Fg addition. (B) The bar graph shows the values of the mean fluorescence intensity displayed by the different populations of activated platelet.

values of mean fluorescence intensity in the activated platelet population from the parents and the control were more than 10-fold higher than in the patient. DTT stimulated the binding of platelets from the parents and normal controls to Fg, but no effect was observed on platelets from the proband (Fig. 2).

#### Identification of mutations in the $\beta 3$ gene

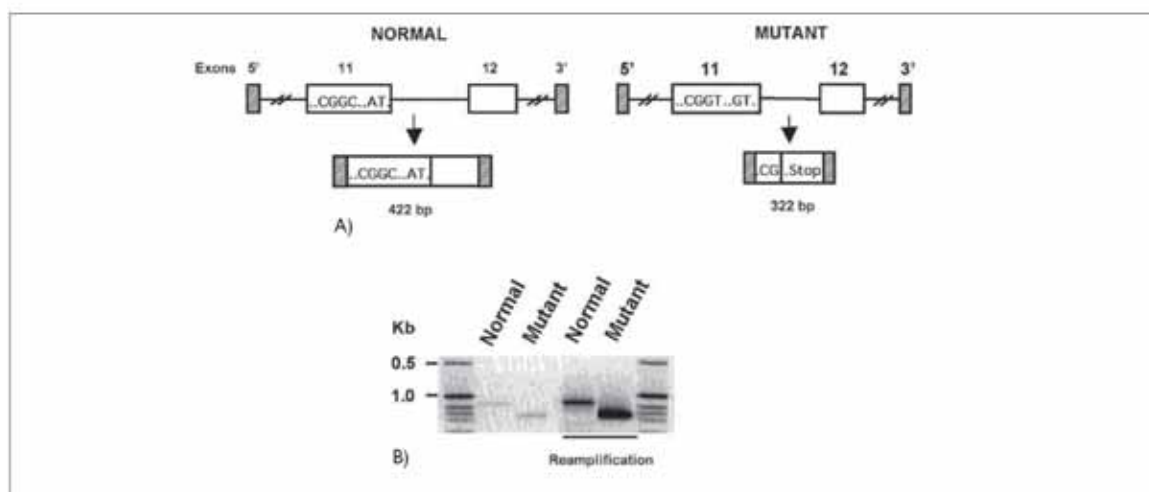
The reduced platelet  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 content in both parents suggested that the patient could have inherited a mutation from each progenitor. The virtual absence of both  $\alpha$ IIb and  $\beta 3$  in platelets from the patient, demonstrated by flow cytometry and western analysis, suggested that the lack of the complex at the surface was due to a limited availability of  $\beta 3$ . Thus, we first searched for mutations in the  $\beta 3$  gene by sequencing PCR-amplified overlapping fragments of reversed transcribed  $\beta 3$ -mRNA. This analysis revealed a 100-nucleotide deletion, corresponding to the 3'-end of exon 11, in the patient (Fig. 3). The deletion results in a shift of the reading frame and the appearance of a premature stop codon after 30 altered amino acids, at a position equivalent to amino acid 635 (609 in the mature peptide) (Fig. 3A). The aberrant tran-



**Figure 3: Identification of mutations and semi-quantitative analysis of platelet  $\alpha$ IIb and  $\beta 3$  mRNAs.** A) PCR amplification and sequencing of genomic DNA and alternative splicing forms of  $\beta 3$ -mRNA were performed as described in Materials and methods. B) The RT-PCR amplification and analysis of platelet  $\alpha$ IIb and  $\beta 3$  mRNAs from the proband (P), his parents (F and M) and a mixture of control RNA (C) was carried out as described in Materials and methods.

script is predicted to encode a severely truncated  $\beta 3$  subunit consisting of only 633 amino acids, 155 residues shorter than the normal protein, lacking the transmembrane and cytoplasmic domains, and carrying an abnormal and truncated amino acid composition at the extracellular carboxyterminal region. The deleted transcript was not detected in the parents of the patient, even after re-amplification of the RT-PCR initial product.

To determine whether the deleted transcript was due to abnormal splicing we amplified fragments of genomic DNA encompassing exons 11–12 and the adjacent regions of introns 10 and 12. Sequence analysis demonstrated that the proband was homozygous and both parents heterozygous for two point substitutions in exon 11: a C  $\rightarrow$  T at nucleotide 1815, and an A  $\rightarrow$  G at position 1843 (Fig. 3A). The C1815T transition does not change the amino acid residue but it generates a consensus GTAAGT donor-splice site at the 5'-end of the deleted sequence (Fig. 3A), suggesting that is involved in the abnormal splicing of exon 11. The A1843G transition would result in the change of Ile to Val at position 615 (residue 589 in the mature  $\beta 3$  peptide), and was not detected in the mRNA analysis since is located within the DNA



**Figure 4: Exontrap analysis of  $\beta 3$  genomic fragments.** A) Fragments of normal and mutant genomic DNA of  $\beta 3$  were cloned into the expression vector pET01, in which the intron containing the multicloning site is framed by the 5' donor and 3' acceptor splice sites. CHO cells were transiently transfected with the normal or mutated  $\beta 3$  construct as described in Materials and methods. The figure shows the splicing patterns deduced by sequencing analysis of the reverse transcriptase-PCR products shown in panel B.

fragment of exon 11 that is not transcribed. These mutations were not found in a significant number of DNAs from normal healthy donors. Moreover, no other mutations were identified in the proband and his parents after complete analysis of  $\beta 3$  and  $\alpha IIb$  coding sequences.

#### Platelet content of $\alpha IIb$ and $\beta 3$ mRNAs

The practical absence of platelet  $\beta 3$  content observed in the proband could be the result of either a limited availability of  $\beta 3$ -mRNA or a failure of the predicted mutant  $\beta 3$  protein to complex  $\alpha IIb$  or to undergo the trafficking pathway at normal rates. Nevertheless, the failure to amplify the deleted transcript from the parents suggested that it was present in very limited amounts. To elucidate this question, we performed a PCR-based semi-quantitative analysis of the platelet  $\beta 3$ -mRNA, using the mRNA of the  $\alpha IIb$  gene as internal control. The amplification reactions were performed under predetermined conditions of number of cycles and template RNA concentration within the range of linearity of DNA amplification. As shown in Figure 3B, the ethidium bromide-staining of the  $\alpha IIb$  RT-PCR products showed similar intensities in all the analyzed individuals. However, the amplification product of  $\beta 3$ -mRNA from the patient showed a smaller size and a marked reduction of intensity (~90 % of control), assessed by densitometry analysis of the ethidium bromide-stained gels.

#### Alternative splicing forms of platelet $\beta 3$ -mRNA in the proband

We found it of interest to determine whether the identified C1815T and A1843G mutations yielded alternate mRNA forms other than those detected in the sequence analysis of the RT-PCR product. To investigate this possibility, the overlapped PCR amplified fragments from reverse transcribed  $\beta 3$ -mRNA were

cloned, and the DNA sequence of individual clones was determined.

All the analyzed clones corresponded to the transcript identified in the direct sequencing of the RT-PCR product suggesting that, virtually, all the  $\beta 3$ -mRNA expressed in the patient correspond to this alternative splicing form. This also indicates that the downstream GT, created as a result of the A1843G mutation, does not seem to operate as an active splicing donor site.

#### Exontrap analysis of normal and mutant $\beta 3$ alleles

To prove whether the C to T transition is necessary and sufficient to dictate abnormal splicing, we analyzed the splicing of this portion of the  $\beta 3$  gene transfected into CHO cells, using the exontrap vector system (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Germany). Figure 4A schematically displays the minigene constructs used in these experiments. We examined the  $\beta 3$  transcript generated from the normal and mutant alleles by RT-PCR. The construct containing the splice site mutation yielded a single transcript smaller in size than the transcript found in cells transfected with the normal construct (Fig. 4B). Sequence analysis revealed that the mutant transcript lacked 100 nucleotides as the result of the preferential use of a new splice-donor site generated by the mutation. No other transcripts were appreciated in the re-amplification of either the normal or the mutant RT-PCR product.

#### Discussion

The present work aimed at investigating the molecular basis of the bleeding disorder presented by a patient with clinically diagnosed Glanzmann thrombasthenia (GT). The virtual absence of both platelet  $\alpha IIb\beta 3$  and  $\alpha \beta 3$ , assessed by flow cytometry and western analysis, confirmed that the patient suffered of type I GT

and suggested that a limited availability of the  $\beta 3$  subunit was involved in the etiopathogenesis of the disease.

The sequence analysis of the  $\beta 3$ -cDNA from the patient revealed a deletion of 100 nucleotides from cDNA position 1814, corresponding to the 3'-end of exon 11, that results in frame shift and appearance of a premature termination codon after 30 different amino acids. In principle, the failure to detect the deleted transcript in the progenitors, who are first cousins and both showed reduced platelet  $\alpha \text{Ib}\beta 3$  content, suggested that it was present in very limited amounts. Sequencing of the corresponding genomic DNA fragment revealed that the deleted region was present in the genomic DNA and that the proband was homozygous and both parents heterozygous for two point substitutions within the fragment deleted in the cDNA: C1815T and A1843G transitions. The first one, silent with respect to the amino acid residue, generates a GTAAGT sequence that matches the intronic hexamer of the more extended consensus sequence at the splice-donor site,  $^{\wedge}\text{CAG/GT}^{\wedge}\text{AGT}$ , where  $\wedge$  indicates the exon-intron boundary. The lack of the normal transcript in the patient suggested that, despite the presence of the normal splice-donor site, the newly created site might be used almost exclusively, resulting in the aberrant splicing of 100 nucleotides at the 3'-end of exon-11. The normal and new splice sequences were analyzed with the SpliceView program (23), which uses the scoring system described by Shapiro and Senapathy (24) to calculate the likelihood that a determined sequence was functional. We found that the novel splice site created by the mutation had a significantly improved score for its potential as a splice site with respect to the normally used sequence (90 and 87, respectively). These theoretical predictions were confirmed by the exontrapping analysis of genomic DNA encompassing either the normal or mutated exon 11, which demonstrated that the identified mutation was forcing alternative splicing of  $\beta 3$ -mRNA.

The deleted transcript contains a premature termination codon, which is predicted to inactivate the expression product of the mutant allele. The semi-quantitative RT-PCR assay demonstrated a marked reduction of the aberrant transcript, which is consistent with the abnormal transcript being removed by non-sense-mediated decay (NMD). NMD is a surveillance mechanism that insures that only correctly processed mRNA, capable of encoding functional peptides, are translated (25). This post-transcriptional process, limiting the expression of potentially dominant negative proteins, may benefit heterozygous individuals. However, in some instances, it could be responsible for the clinical picture of protein deficiency since it also degrades aberrant transcripts encoding proteins that are fully or partially functional (26). In mammals, the distinction between a normal and a premature stop codon is based on its location with respect to the last exon-exon junction: when an alternative splice introduces a stop codon >50 nucleotides upstream of the final exon-exon splice junction, the stop codon is classified as a premature termination codon and the corresponding mRNA isoform labeled a NMD candidate (27). However, transcripts containing PTCs might escape NMD (28), and inter-tissue and inter-individual variations in NMD efficiency have been reported (29), indicating that the current understanding of this mechanism is incomplete. On the other hand, since NMD does not completely degrade all transcripts carrying PTCs, it is not possible to establish

*a priori* whether a PTC-containing mRNA might yield or not significant amounts of truncated protein. Therefore, as stated in this work, determination of both the aberrant transcript levels and protein expression seems to be necessary to correctly infer the functional consequences of any mutation resulting in PTC.

The conclusions derived from the mRNA analysis match the results on the translational level. The deleted transcript, the only form of  $\beta 3$ -mRNA found in the patient, is predicted to encode a truncated  $\beta 3$  protein, 155 residues shorter than the normal protein, lacking the transmembrane and cytoplasmic domains, and with an abnormal amino acid composition at the extracellular carboxyterminal fragment. The aberrant protein was not detected in the western blotting analysis of either the platelet lysate or the plasma from the proband and his parents. This is consistent with a previous report in which a similarly truncated  $\beta 3$  subunit failed to complex  $\alpha \text{Ib}$  and reach the cell surface (30). Thus, the lack of  $\alpha \text{Ib}\beta 3$  at the platelet surface could be due to both unstable  $\beta 3$  transcripts and degradation of the truncated protein. Unexpectedly, the western blot demonstrated the presence of residual amounts of normal sized  $\beta 3$  proteins in the patient, suggesting that a very small proportion of the pre-mRNA was normally processed and translated. This protein product would contain the A1843G transition, which is predicted to change Ile to Val at position 615 (residue 589 in the mature  $\beta 3$  peptide). It is very improbable that this slight amount of protein had either a functional role or significant impact on the clinical phenotype. Binding of radiolabeled fibrinogen to platelets has been previously reported to be undetectable in type I GT (31, 32). In the present report, the increase of fluorescence induced by agonists in the GT platelets (Fig. 2) is not sufficient to support platelet aggregation and it might represent non-specific binding of the FITC-labeled fibrinogen.

The proportion of mutations identified at the DNA level that are predicted to affect mRNA splicing has often been underestimated (33, 34). Usually, point substitutions in the coding sequences of genes are assumed to cause diseases by changing single amino acids in the encoded proteins. However, many recent reports show that an increasing number of human genetic disorders are due to exonic mutations that alter pre-mRNA processing (35). Although the analysis at the mRNA level can be complicated due to the very low abundance of the abnormal mRNA species, the identification of these alternative transcripts may be the only way to demonstrate that an apparently 'silent' mutation, often considered as neutral allelic polymorphisms, is causing a disease. We report here a translational silent mutation that can inactivate the gene by inducing the splicing machinery to skip part of the mutant exon. This is a clear example of genetic defect in which the characterization solely at the genomic level would have led to a misleading interpretation of the functional consequence of the identified mutations. *A priori*, the presumed consequence of the two transitions found in the genomic DNA is the production of a normal size protein carrying the Ile589Val substitution. Moreover, the low level of protein detected in the western analysis would have supported the erroneous conclusion that the underlying mechanism for the reduced expression of  $\alpha \text{Ib}\beta 3$  is that [589Val] $\beta 3$  is unable to undergo the normal secretory pathway. Therefore, our study confirms the importance of analyzing mutations at the genomic and RNA levels in order to



elucidate the correct mechanism of gene inactivation that, in some instances, may provide useful information about the structure-function relationship of the encoded protein.

In summary, we describe a splice defect in the mRNA of  $\beta 3$  that leads to the deletion of the 3'-end of exon 11 and appearance of a premature termination codon. The aberrant transcript is the result of an apparent silent polymorphism that creates a new splice-donor site that is used preferentially. The absence of

$\alpha IIb\beta 3$  complex in the platelet membrane seems to be due to instability of both PTC-containing transcripts and truncated translational products.

## Acknowledgments

We are grateful to the patient and family that participated in this study, and to Dr. G. Rivard (Hopital Sainte-Justine, Montreal, Canada) for referring the family.

## References

1. Caen JP. Glanzmann's thrombasthenia. *Clin Haematol* 1972; 1: 383-92.
2. George JN, Caen JP, Nurdan AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood* 1990; 75: 1383-95.
3. Nurdan AT, Caen JP. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet functions. *Nature* 1975; 255: 720-2.
4. Pytela RP, Piensbach MD, Ginsberg MH, et al. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa: Member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science* 1986; 231: 1559-62.
5. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa. The responsive integrin. *Cell* 1991; 65: 359-62.
6. <http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann>
7. <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>
8. French DL. The molecular genetics of Glanzmann's thrombasthenia. *Platelets* 1998; 9: 5-20.
9. Bellucci S, Caen J. Molecular basis of Glanzmann's thrombasthenia and current strategies in treatment. *Blood Rev* 2002; 16: 193-202.
10. Ferrer M, Tao J, Iruin G, et al. Truncation of glycoprotein (GP) IIIa (A 616-762) prevents complex formation with GPIIb: novel mutation in exon 11 of GPIIIa associated with thrombasthenia. *Blood* 1998; 92: 4712-20.
11. González-Manchón C, Fernández-Pinel M, Arias-Salgado EG, et al. Molecular genetic analysis of a compound heterozygote for the GPIIb gene associated with Glanzmann's thrombasthenia. Disruption of the 674-687 disulfide bridge in GPIIb prevents surface expression of GPIIb-IIIa. *Blood* 1999; 93: 866-75.
12. Kiyoi T, Tomiyama Y, Honda S, et al. A naturally occurring Tyr143HisGPIIb mutation abolishes  $\alpha IIb\beta 3$  function for soluble ligands but retains its ability for mediating cell adhesion and clot retraction: comparison with other mutations causing ligand-binding defects. *Blood* 2003; 101: 3485-91.
13. Kato A, Yamamoto K, Mizaki S, et al. Molecular basis for Glanzmann's thrombasthenia (GT) in a compound heterozygote with glycoprotein IIb gene: A proposal for classification of GT based on the biosynthetic pathway of glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1992; 79: 3212-8.
14. Peretz H, Rosenberg N, Usher S, et al. Glanzmann's thrombasthenia associated with deletion-insertion and alternative splicing in the glycoprotein IIb gene. *Blood* 1995; 85: 414-20.
15. González-Manchón C, Arias-Salgado EG, Butta N, et al. A novel homozygous splice junction mutation in GPIIb associated with alternative splicing, nonsense-mediated decay of GPIIb-mRNA, and type II Glanzmann's thrombasthenia. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1071-8.
16. French DL, Collier BS. Hematologically important mutations: Glanzmann thrombasthenia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 1996; 23: 39-51.
17. Jin Y, Dietz HC, Montgomery RA, et al. Glanzmann thrombasthenia. Cooperation between sequence variants in cis during splice site selection. *J Clin Invest* 1996; 98: 1745-54.
18. Osborn MJ, Upadhyaya M. Evaluation of the protein truncation test and mutation detection in the NF1 gene. Mutational analysis of 15 known and 40 unknown mutations. *Hum Genet* 1999; 105: 327-32.
19. Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, et al. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1617-31.
20. Arias-Salgado EG, Butta N, González-Manchón C, et al. Competition between normal [674C] and mutant [674R]GPIIb subunits: role of the molecular chaperone BiP in the processing of GPIIb-IIIa complexes. *Blood* 2001; 97: 2640-47.
21. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
22. Tao J, Arias-Salgado EG, González-Manchón C, et al. A novel [288delC] mutation in exon 2 of GPIIb associated with type I Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol* 2000; 111: 96-103.
23. Splice View. On line program for splice prediction by using consensus sequences. <http://125.itba.mi.cnr.it/webgene/wwwspliceview.html>
24. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes. Sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 7155-74.
25. Maquat LE. When cells stop making sense: effect of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1995; 1: 453-65.
26. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, et al. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 2004; 36: 801-8.
27. Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 89-99.
28. Danckwardt S, Neu-Yilik G, Thermann R, et al. Abnormally spliced beta-globin mRNAs. A single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood* 2002; 99: 1811-6.
29. Kerr TP, Sewry CA, Robb SA, et al. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet* 2001; 109: 402-7.
30. Butta N, Arias-Salgado EG, González-Manchón C, et al. Disruption of the  $\beta 3$  663-687 disulfide bridge confers constitutive activity to  $\beta 3$  integrins. *Blood* 2003; 102: 2491-7.
31. Nurdan AT, Rosa J-P, Fournier D, et al. A variant of glanzmann's thrombasthenia with abnormal glycoprotein IIb-IIIa complexes in the platelet membrane. *J Clin Invest* 1987; 79: 962-9.
32. Westrup D, Santos S, Follert-Hagendorff K, et al. Glanzmann thrombasthenia Frankfurt 1 is associated with a point mutation Thr176Ile in the N-terminal region of  $\beta 3$  subunit integrin. *Thromb Haemost* 2004; 92: 1040-51.
33. Liu HX, Cartegni L, Zhang MQ, et al. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet* 2001; 27: 55-8.
34. Ars E, Serra E, Garcia J, et al. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 237-47.
35. Cartegni L, Chew SL, Kramner AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 285-98.